

TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETECCIÓN DE *Xylella fastidiosa*

Ester Marco Noales

Investigadora

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

marco_est@gva.es



Jornada sobre
Xylella fastidiosa

Programa

12 de febrero de 2019
de 09:15h a 18:00h

En el salón de actos del
Ministerio de Agricultura,
Pesca y Alimentación.
Paseo de la Infanta Isabel, 1.

DIAGNÓSTICO

DETECCIÓN



DIAGNÓSTICO

Identificar la naturaleza y la causa de la enfermedad



DETECCIÓN

DIAGNÓSTICO

Identificar la naturaleza y la causa de la enfermedad



DETECCIÓN

Determinar la presencia del organismo diana en una muestra



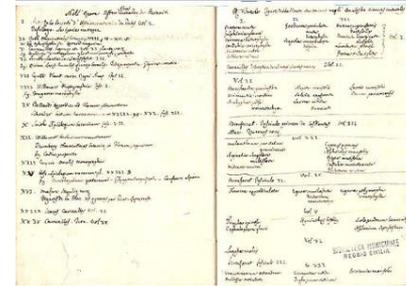
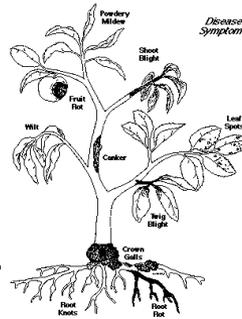
Introducción



Filippo Re

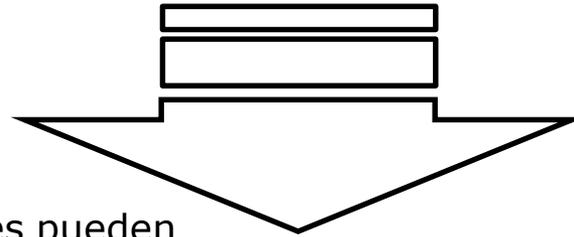
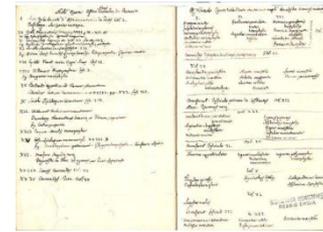
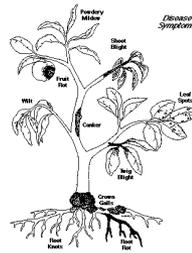


Carlo Berti



Primera mitad del siglo XIX

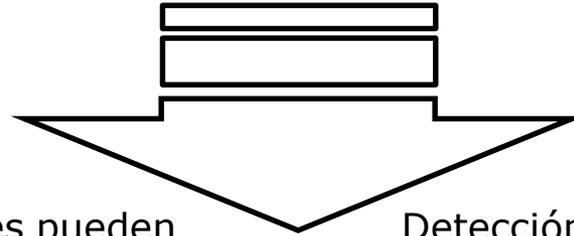
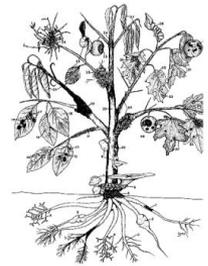
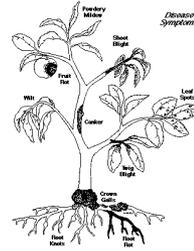
Introducción



Diferentes agentes causales pueden producir síntomas similares

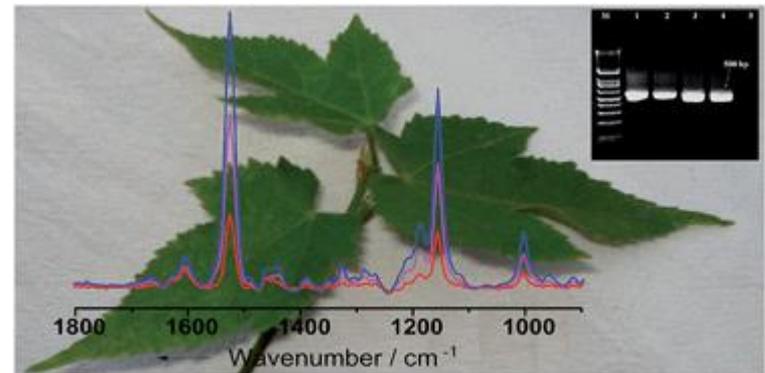


Introducción



Diferentes agentes causales pueden producir síntomas similares

Detección temprana: prevención de la extensión de la enfermedad



Herramientas para el diagnóstico de enfermedades de plantas

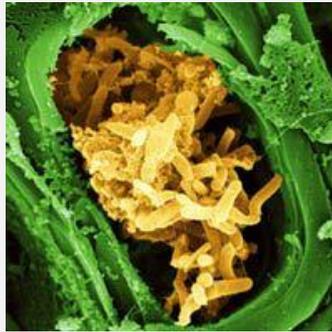
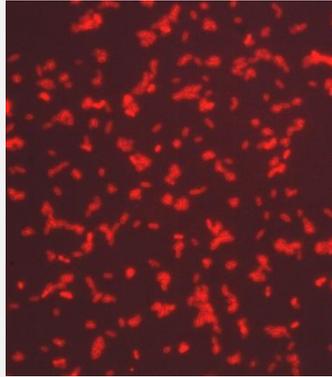


Observación visual
de síntomas

Introducción



Observación visual
de síntomas

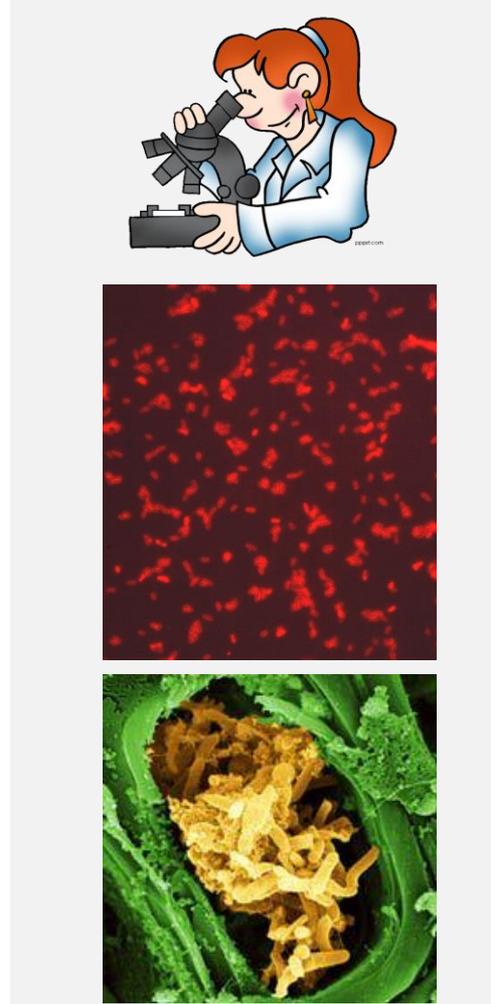


Observación
microscópica de los
organismos patógenos

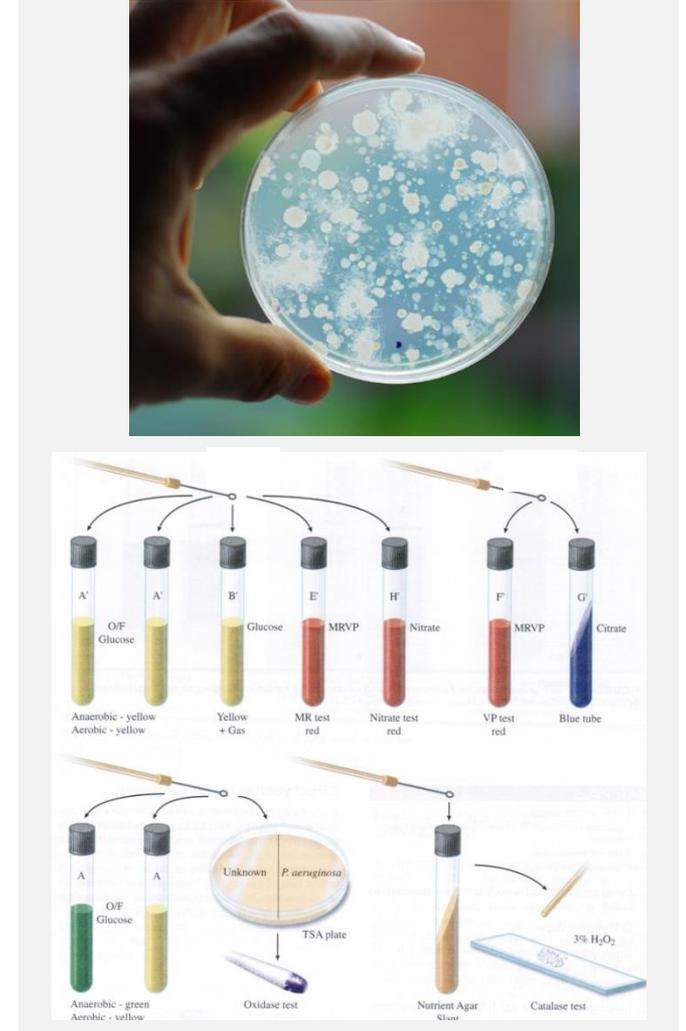
Introducción



Observación visual de síntomas

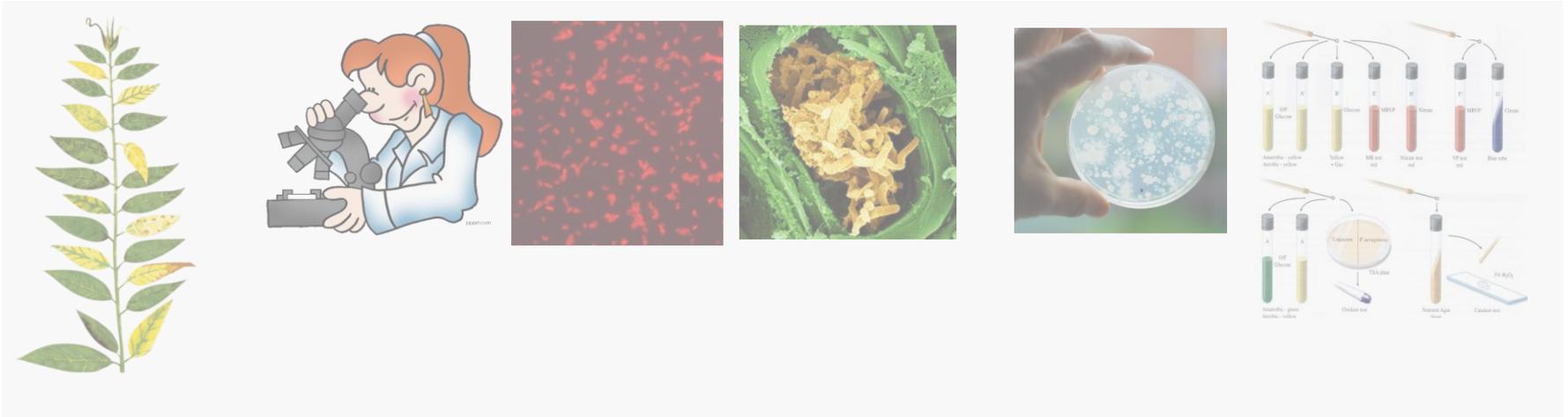


Observación microscópica de los organismos patógenos



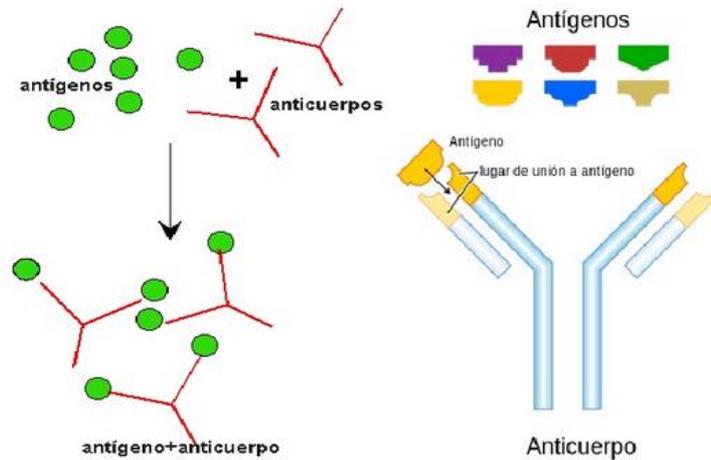
Crecimiento en medios de cultivo y realización de pruebas bioquímicas

Introducción

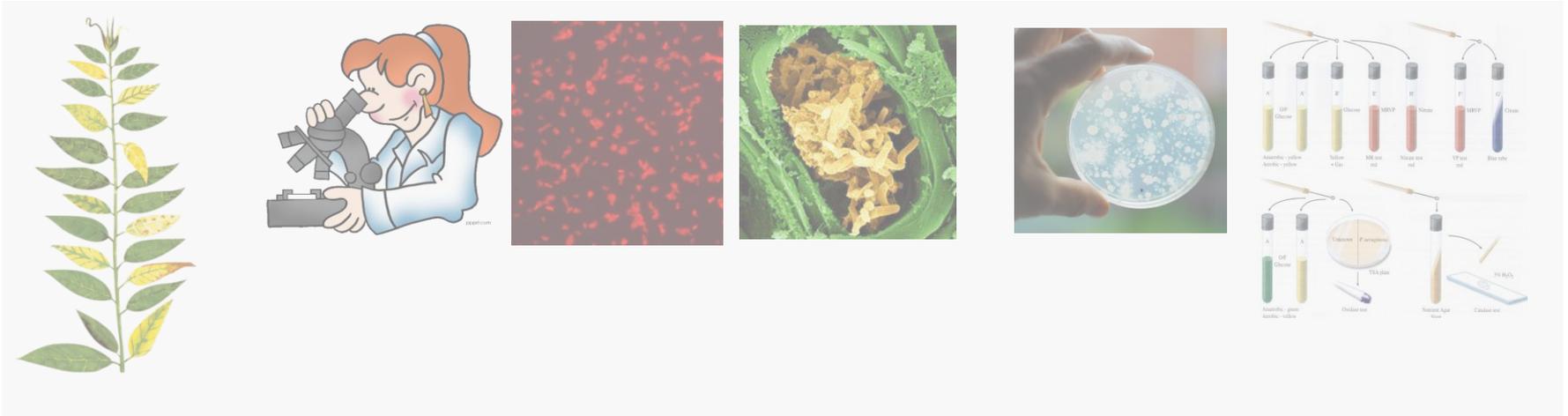


Técnicas serológicas

Reacción antígeno-anticuerpo

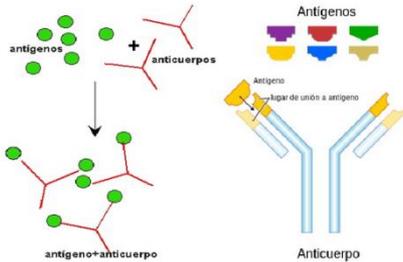


Introducción



Técnicas serológicas

Reacción antígeno-anticuerpo

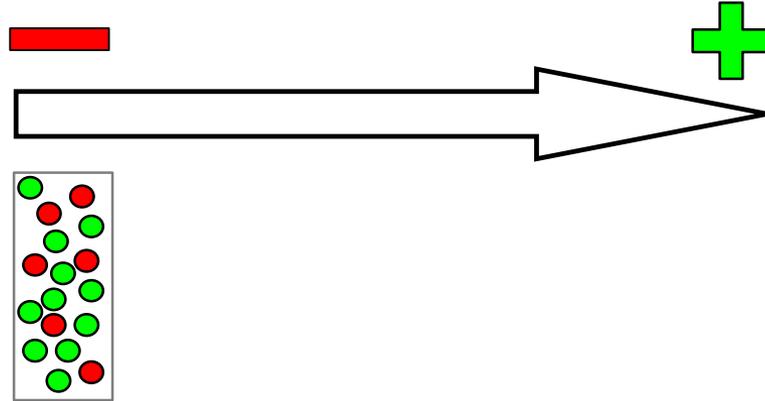


Peter Perlmann y
Eva Engvall, 1971

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

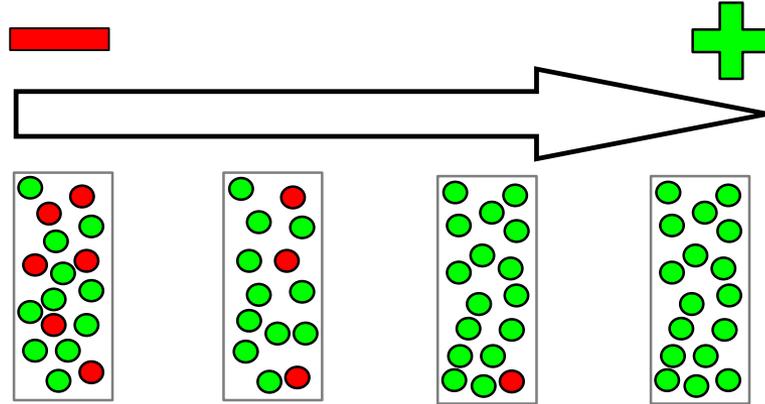


Especificidad



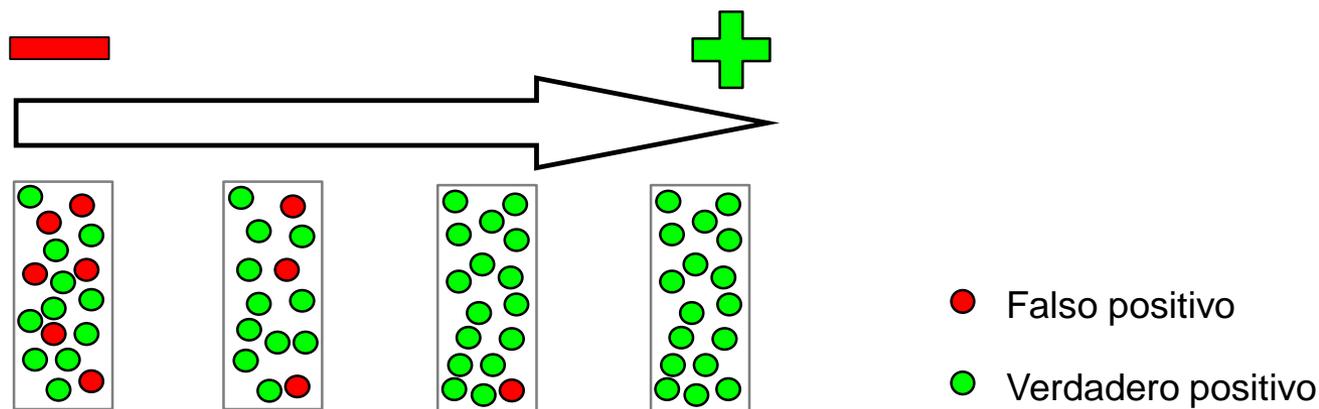
- Falso positivo
- Verdadero positivo

Especificidad

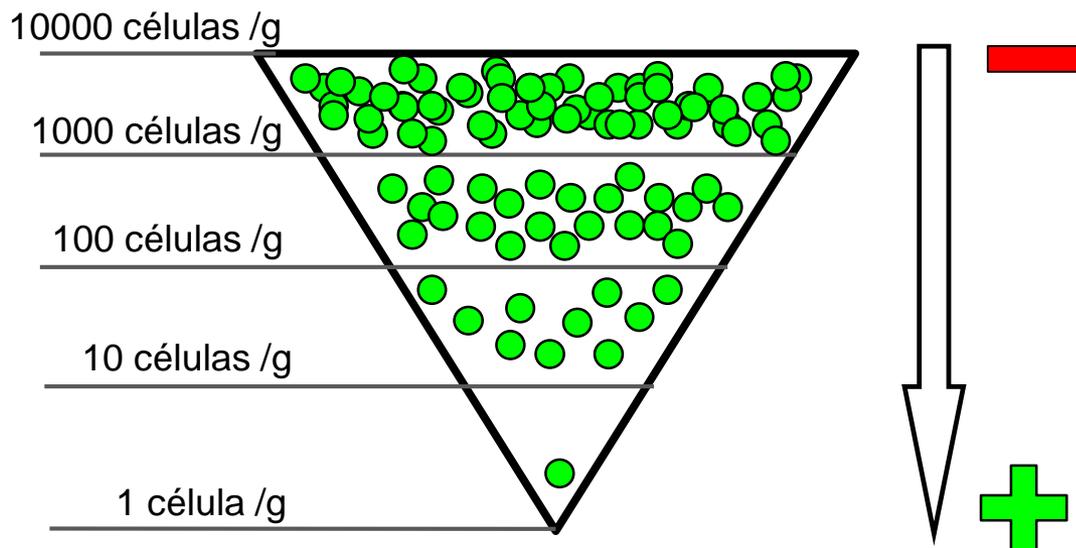


- Falso positivo
- Verdadero positivo

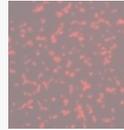
Especificidad



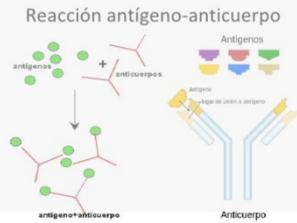
Sensibilidad



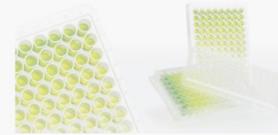
Introducción



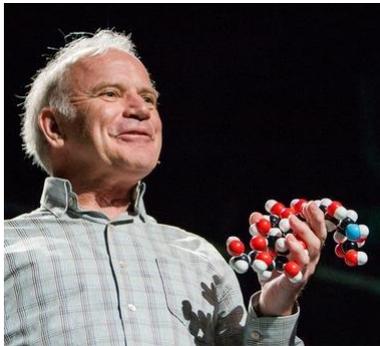
Técnicas serológicas



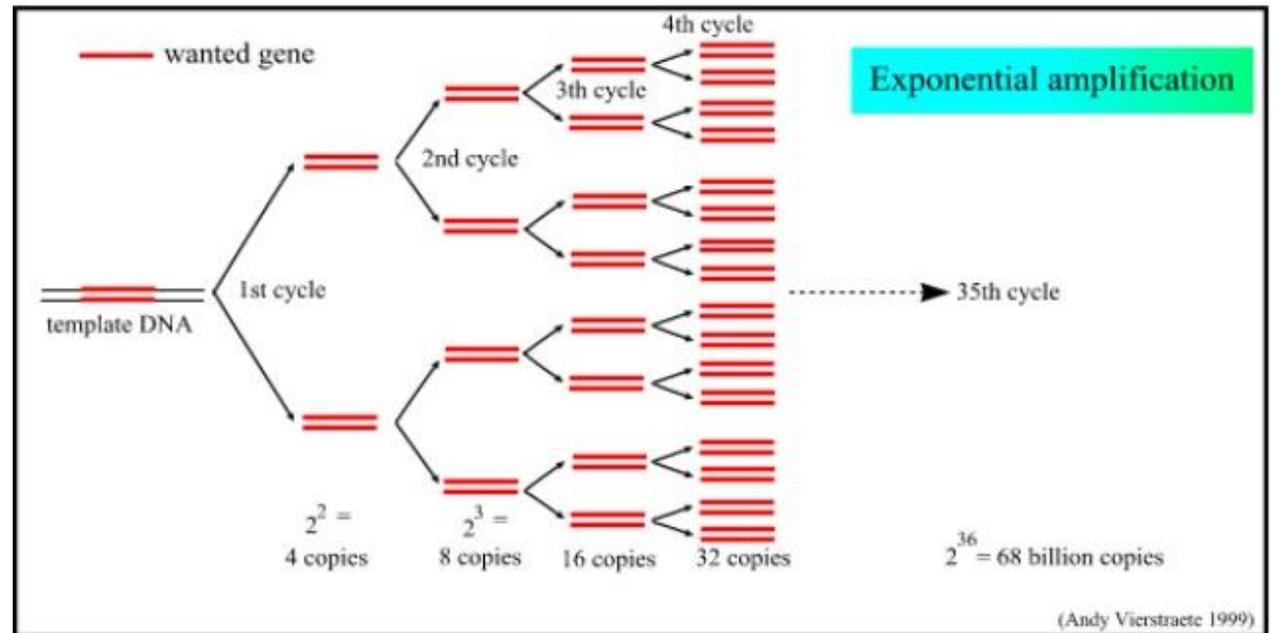
Peter Perlmann y
Eva Engvall, 1971



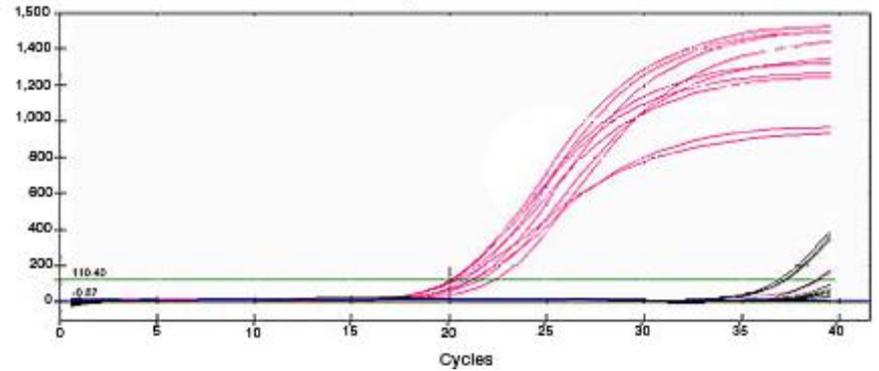
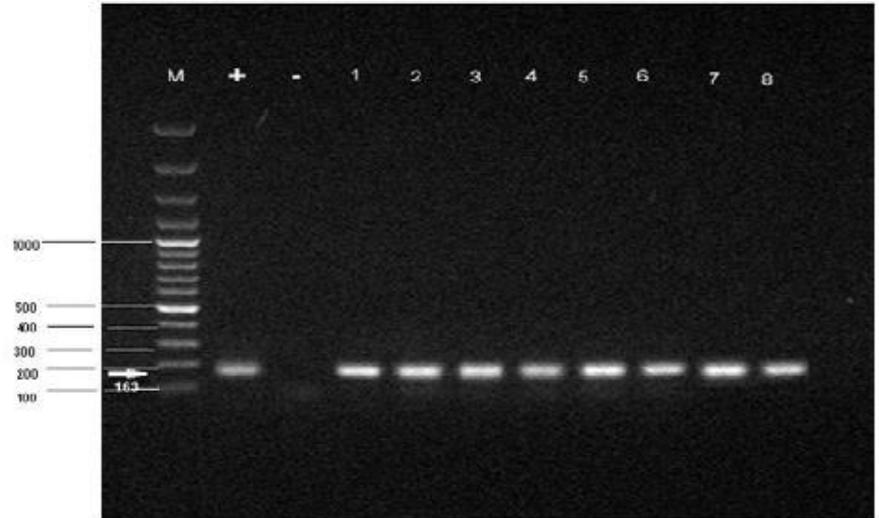
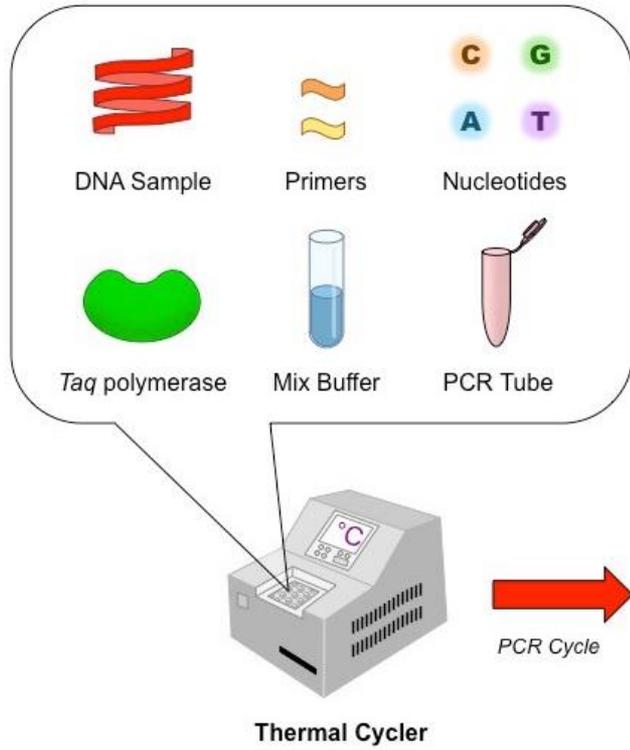
PCR (*Polymerase Chain Reaction*)



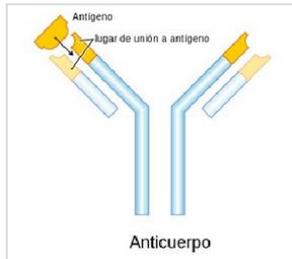
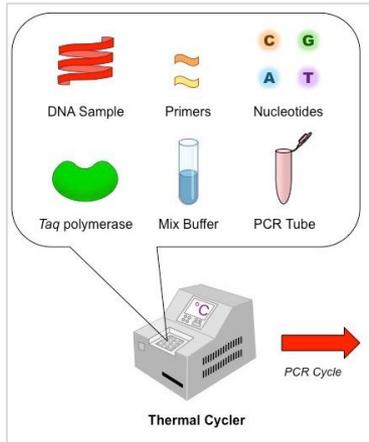
Kary Mullis, 1983



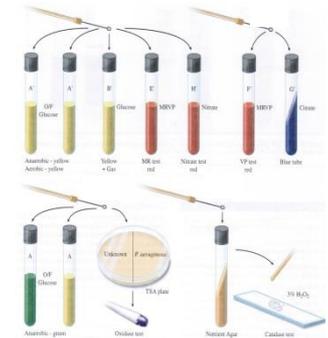
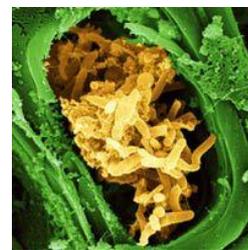
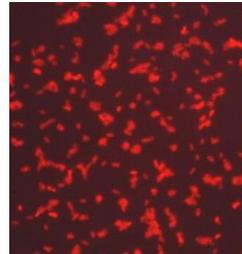
Introducción



Introducción



Información complementaria





¿Xylella fastidiosa?

Dificultades para detectar *Xylella fastidiosa*

Dificultades para detectar Xylella fastidiosa

- ❑ **Es una bacteria de crecimiento muy lento y que requiere medios de cultivos especiales**

Dificultades para detectar *Xylella fastidiosa*

- ❑ Es una bacteria de crecimiento muy lento y que requiere medios de cultivos especiales

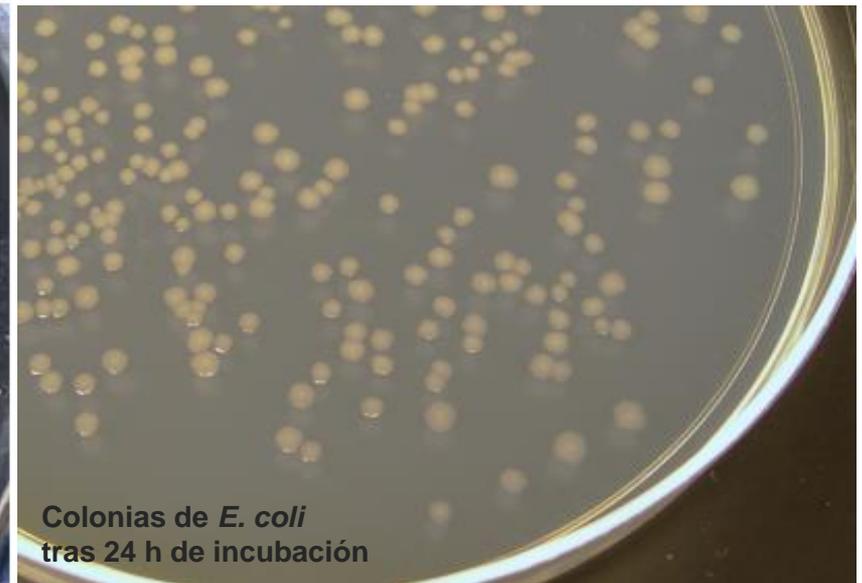
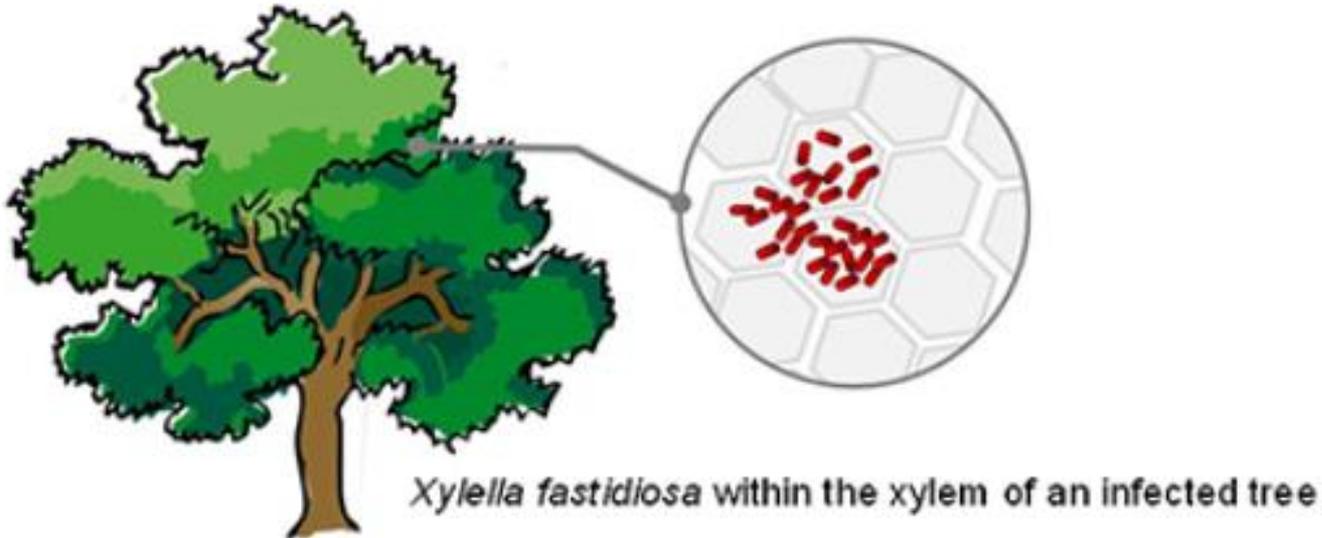


Fig. 24 Collection strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC 35879 on BCYE (size < 2 mm after 3 weeks).

Dificultades para detectar Xylella fastidiosa

- ❑ Es una bacteria de crecimiento muy lento y que requiere medios de cultivos especiales
- ❑ La colonización de la planta es frecuentemente asintomática en muchos hospedadores (infección latente)



Dificultades para detectar Xylella fastidiosa

- ❑ **Es una bacteria de crecimiento muy lento y que requiere medios de cultivos especiales**
- ❑ **La colonización de la planta es frecuentemente asintomática en muchos hospedadores (infección latente)**
- ❑ **Distribución heterogénea de la población bacteriana en la planta**

Técnicas para detectar *Xylella fastidiosa*



Protocolo EPP0 de Diagnóstico de *Xylella fastidiosa*

Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin (2018) 48 (2), 175–218

ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12469

European and Mediterranean Plant Protection Organization
Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

PM 7/24 (3)

Diagnostics
Diagnostic

PM 7/24 (3) *Xylella fastidiosa*

Specific scope

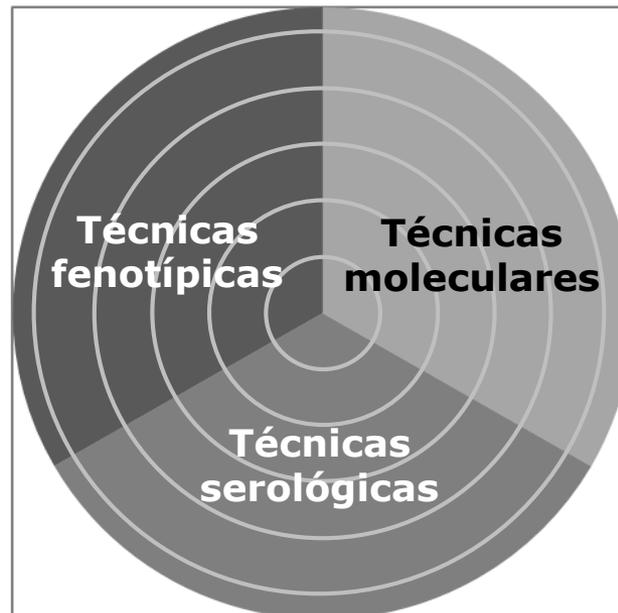
This Standard describes a diagnostic protocol for *Xylella fastidiosa*.¹ It should be used in conjunction with PM 7/76 Use of EPPO diagnostic protocols.

Specific approval and amendment

First approved in 2004-09.
Revised in 2016-09 and 2018-04.²



PM 7 - Diagnostic Protocols



1. Introduction

2. Identity

3. Detection

3.1. Disease symptoms

3.2. Sampling of plant material and sample preparation in the laboratory

3.3. Sampling and sample preparation in the laboratory of vectors

3.4. Screening tests

3.5. Additional tests

3.6. Isolation

4. Identification and subspecies determination

4.1. Identification of pure cultures as *X. fastidiosa*

4.2. Molecular tests for the identification of *X. fastidiosa* and assignment of *X. fastidiosa* subspecies

4.3. Pathogenicity test

4.4. Bioassay



Apéndice 1
ELISA

Apéndice 2
IF test

Apéndice 3
Extracción de ADN

Apéndice 4
PCR convencional
(Minsavage et al., 1994)

Apéndice 5
PCR en tiempo real
(Harper et al., 2010; erratum 2013)

Apéndice 6
PCRs en tiempo real
(basados en Francis et al.,
2006)

Apéndice 7
PCR en tiempo real
(Ouyang et al., 2013)

Apéndice 8
PCR en tiempo
real
(Li et al., 2013)

Apéndice 9
LAMP en tiempo real

Apéndice 10
Tampones y medios

Apéndice 11
Procedimientos de
aislamiento

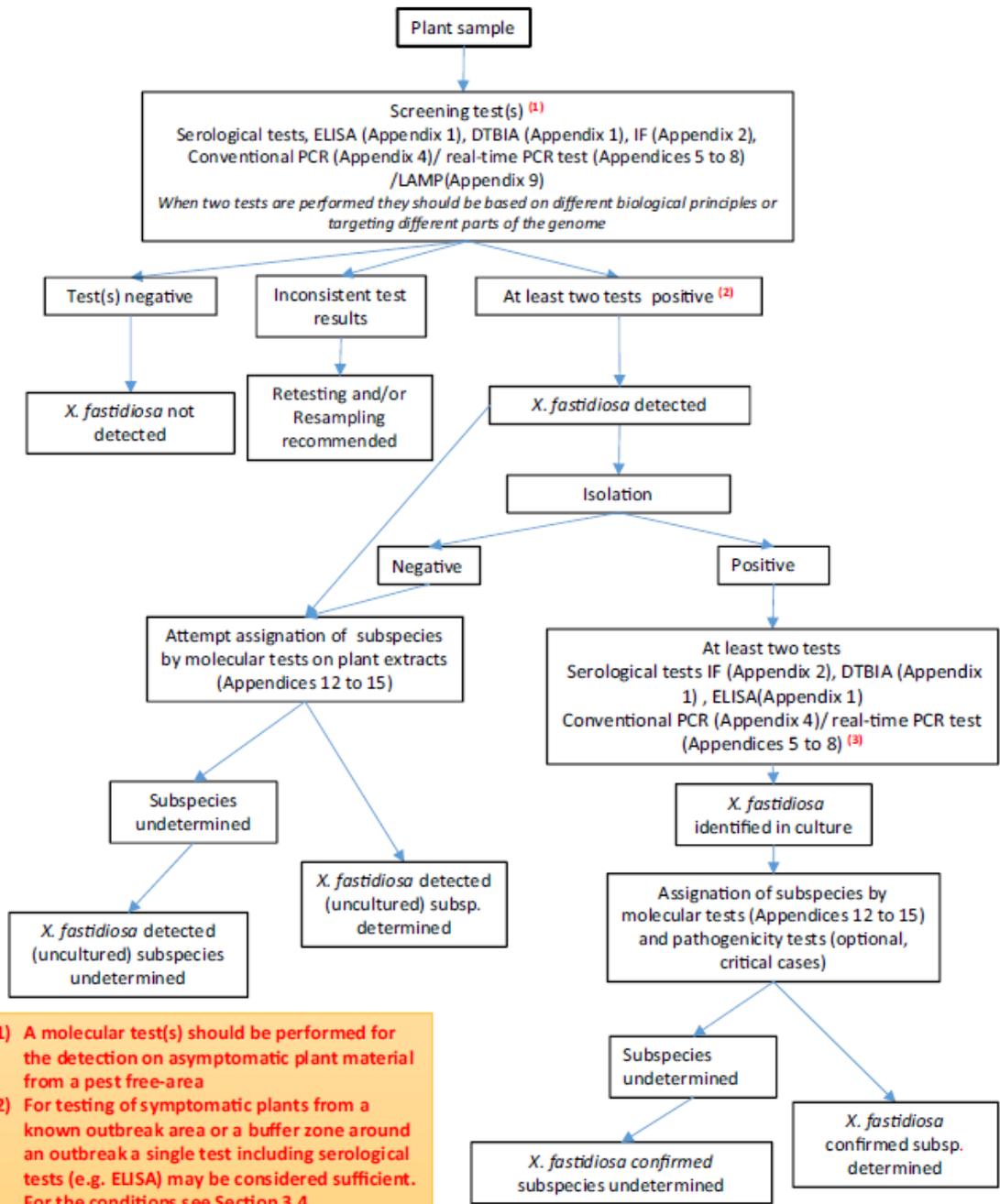
Apéndice 12
*Multilocus sequence
typing (MLST)*
(Yuan et al., 2010)

Apéndice 13
PCR convencional
(Pooler and Hartung, 1995)

Apéndice 14
PCR convencional simple
(Hernandez-Martinez et al., 2006)

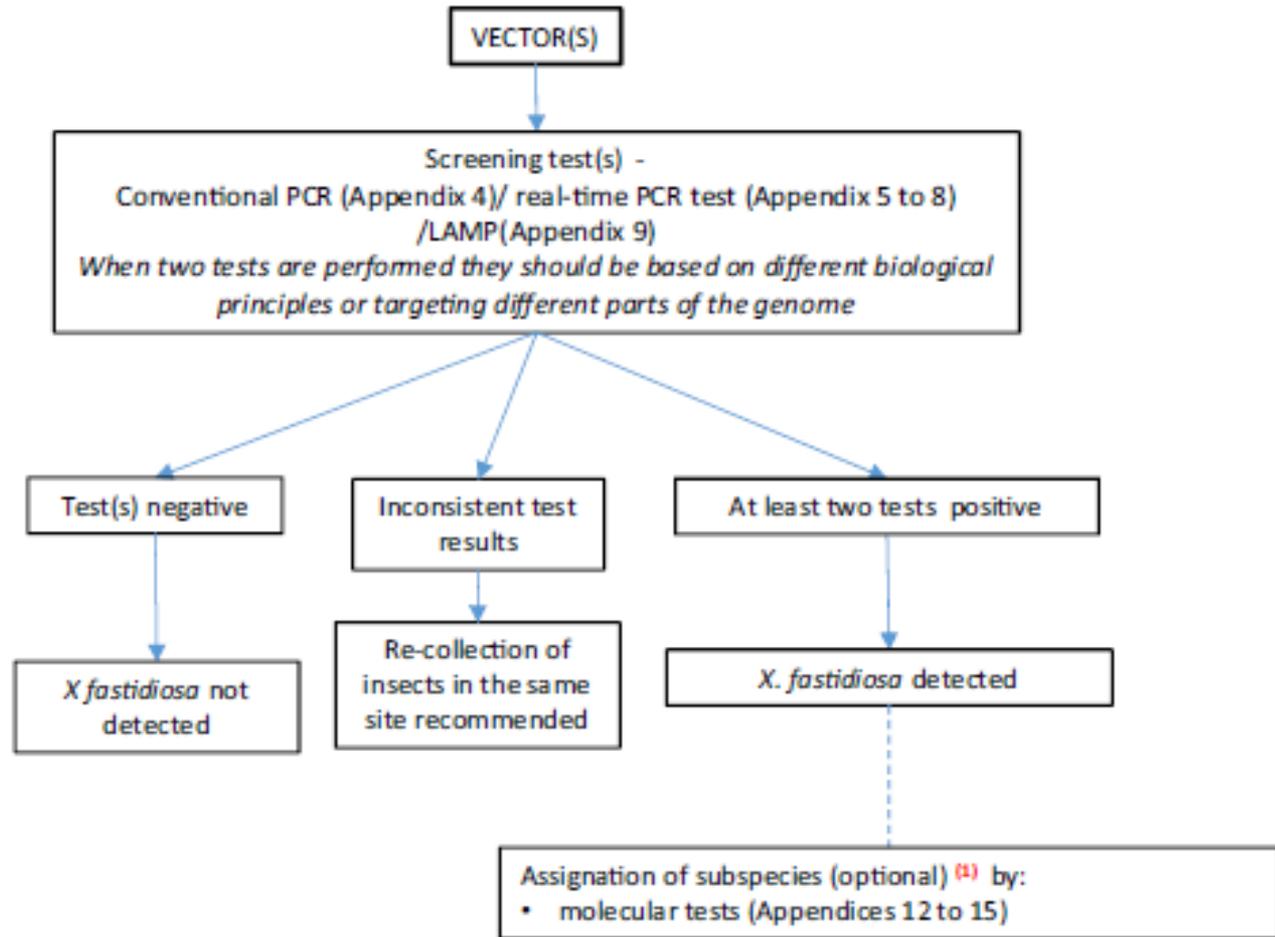
Apéndice 15
PCR convencional múltiple
(Hernandez-Martinez et al., 2006)

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



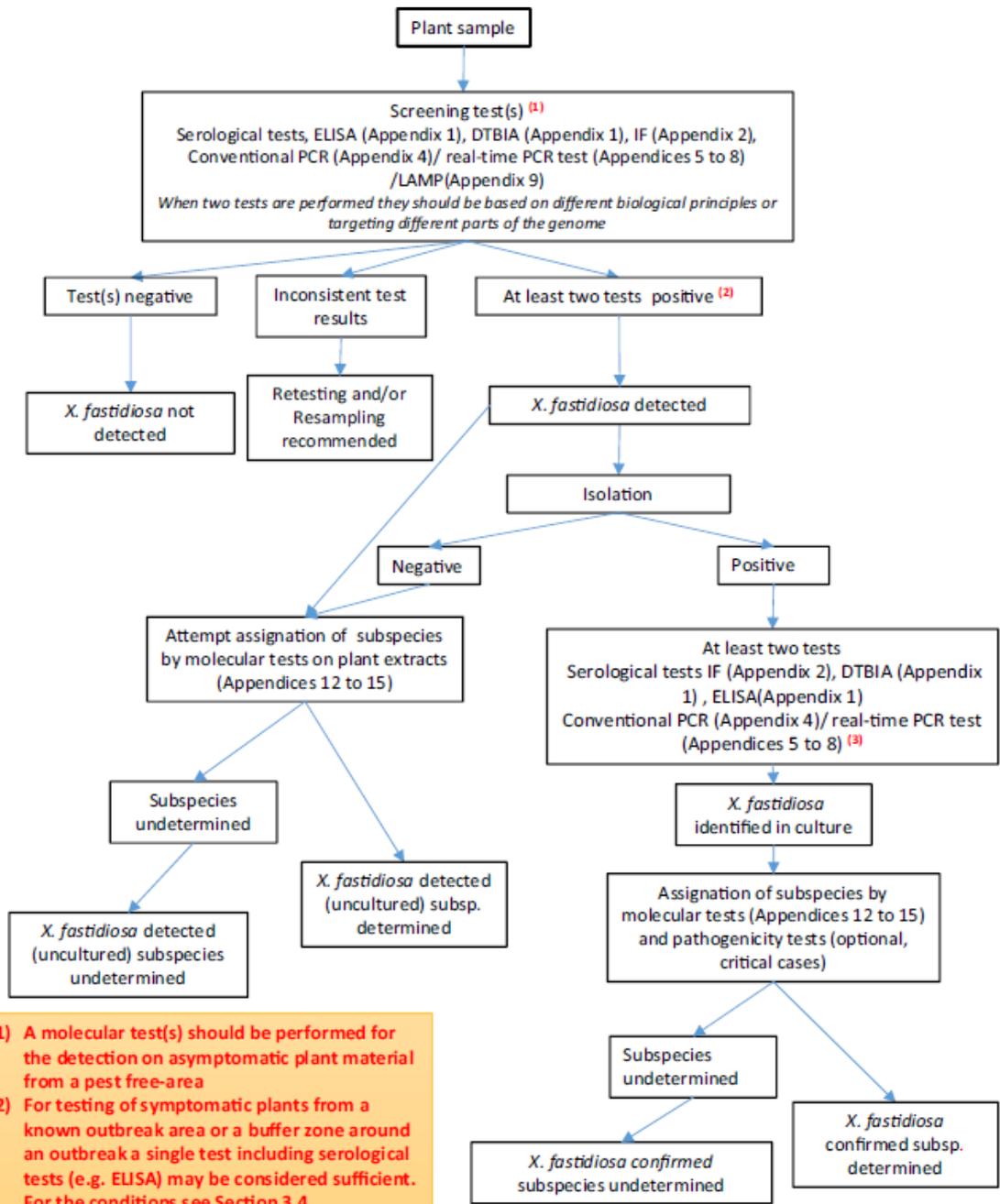
- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en vectores (EPPO, 2018)



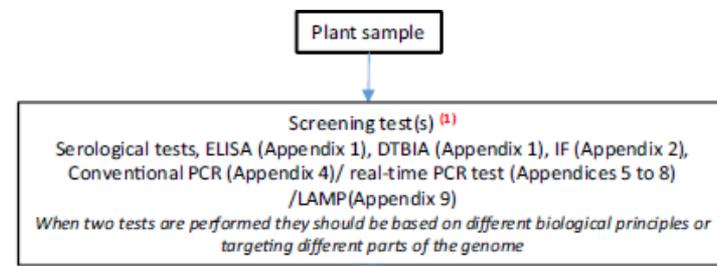
(1) There is little experience with the assignment of subspecies from insects extracts based on the molecular tests described in Appendix 12 to 15. This is more difficult for insects than plant extracts due to low concentration of bacteria and limited amount of DNA from a single insect.

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



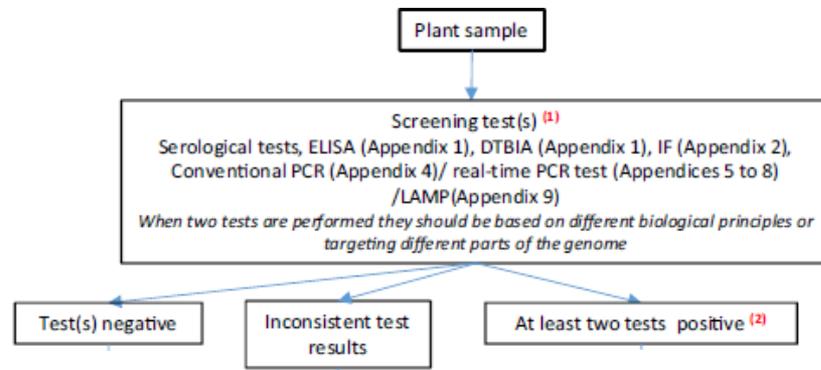
- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



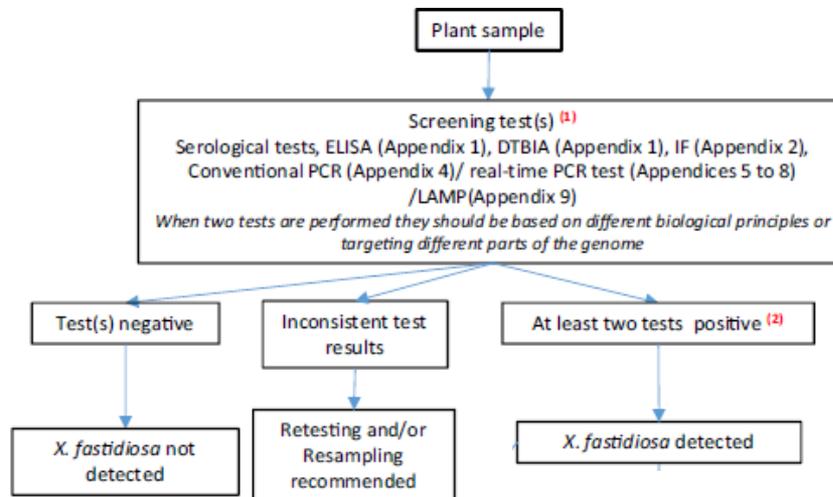
- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



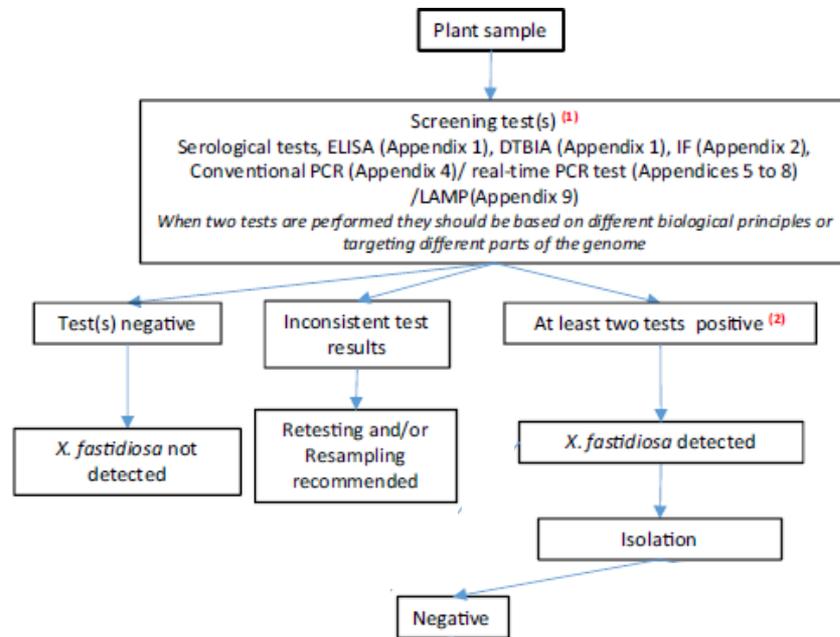
- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



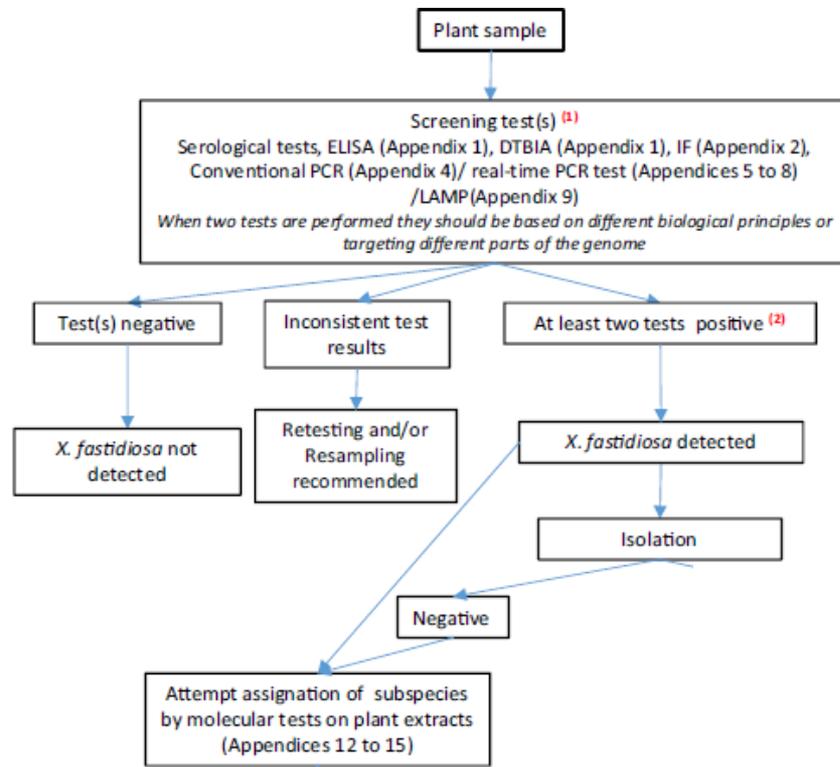
- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



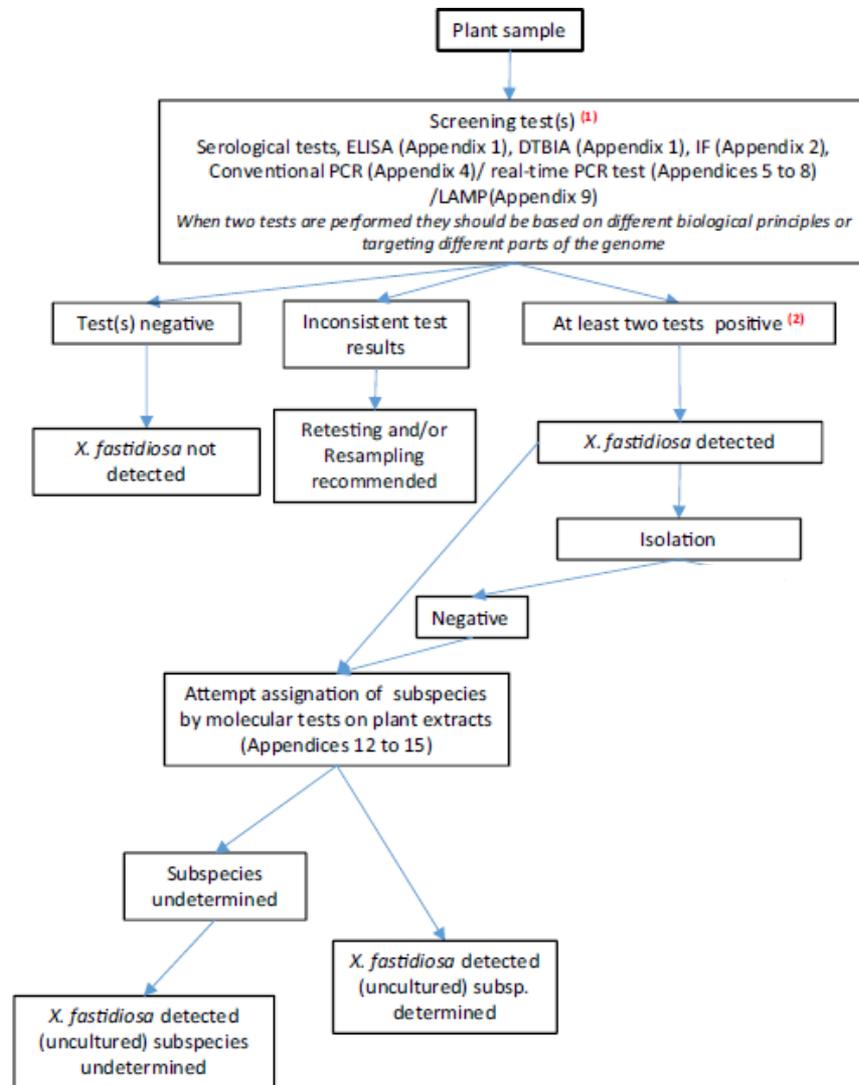
- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



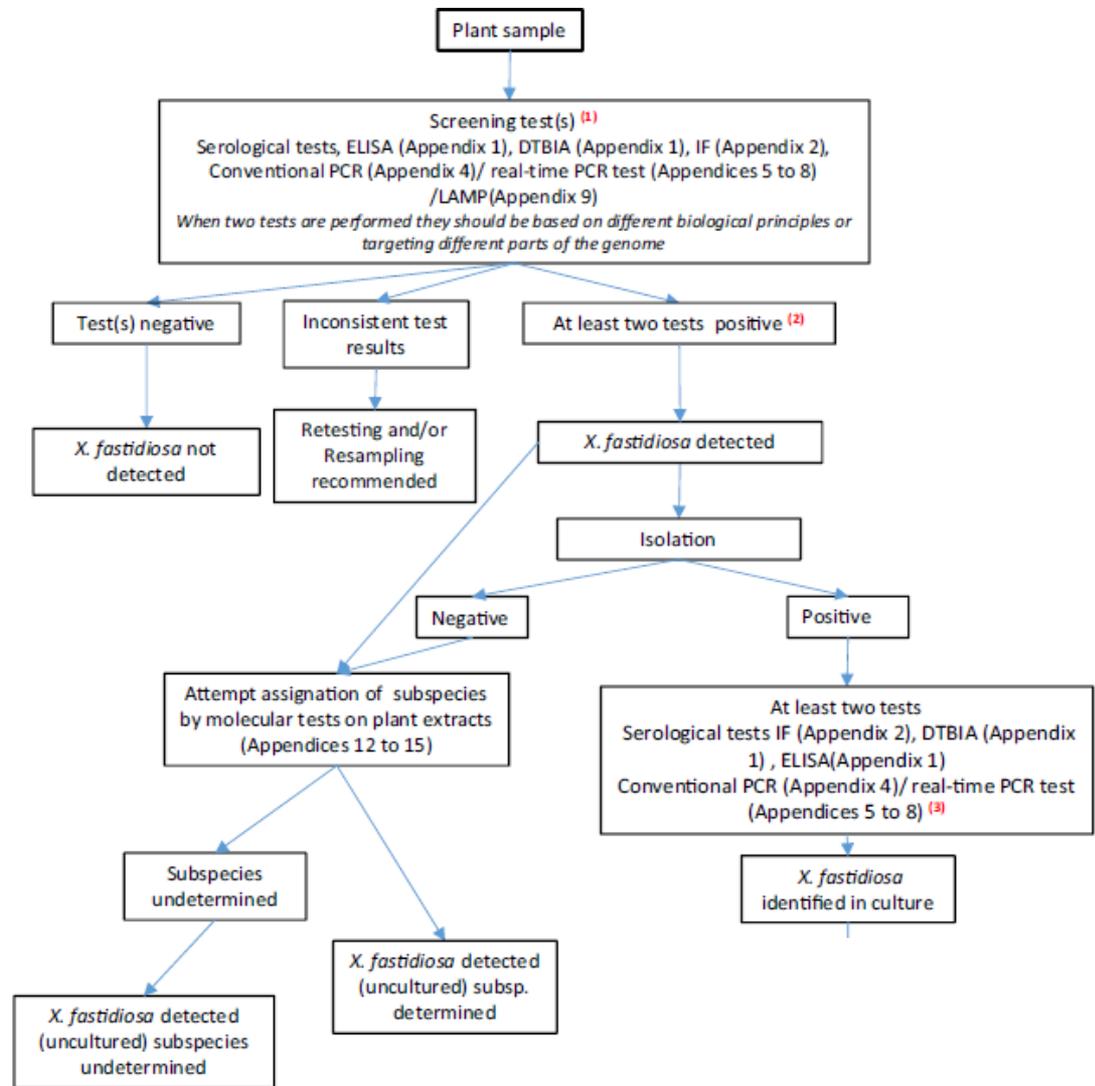
- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



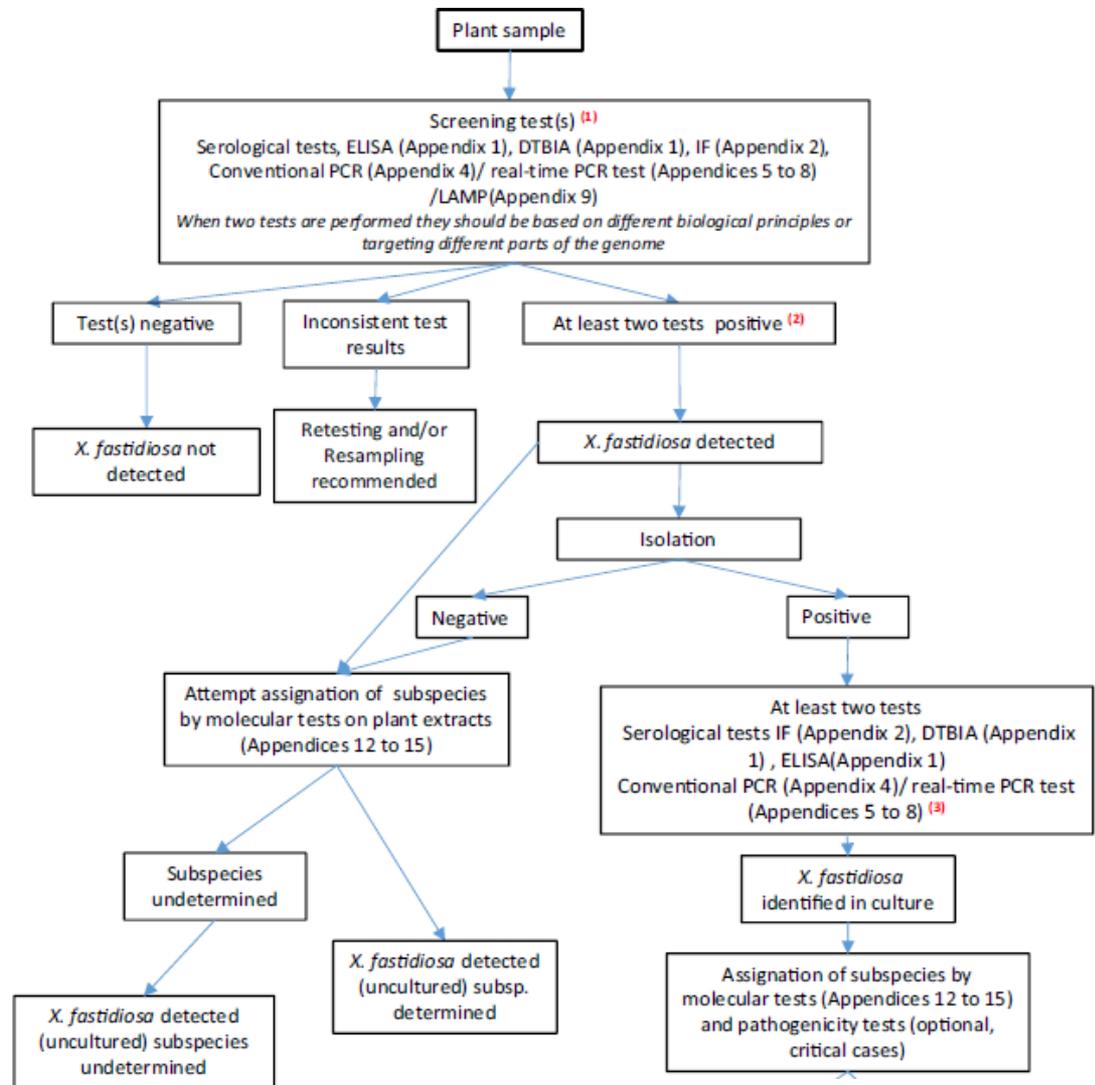
- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



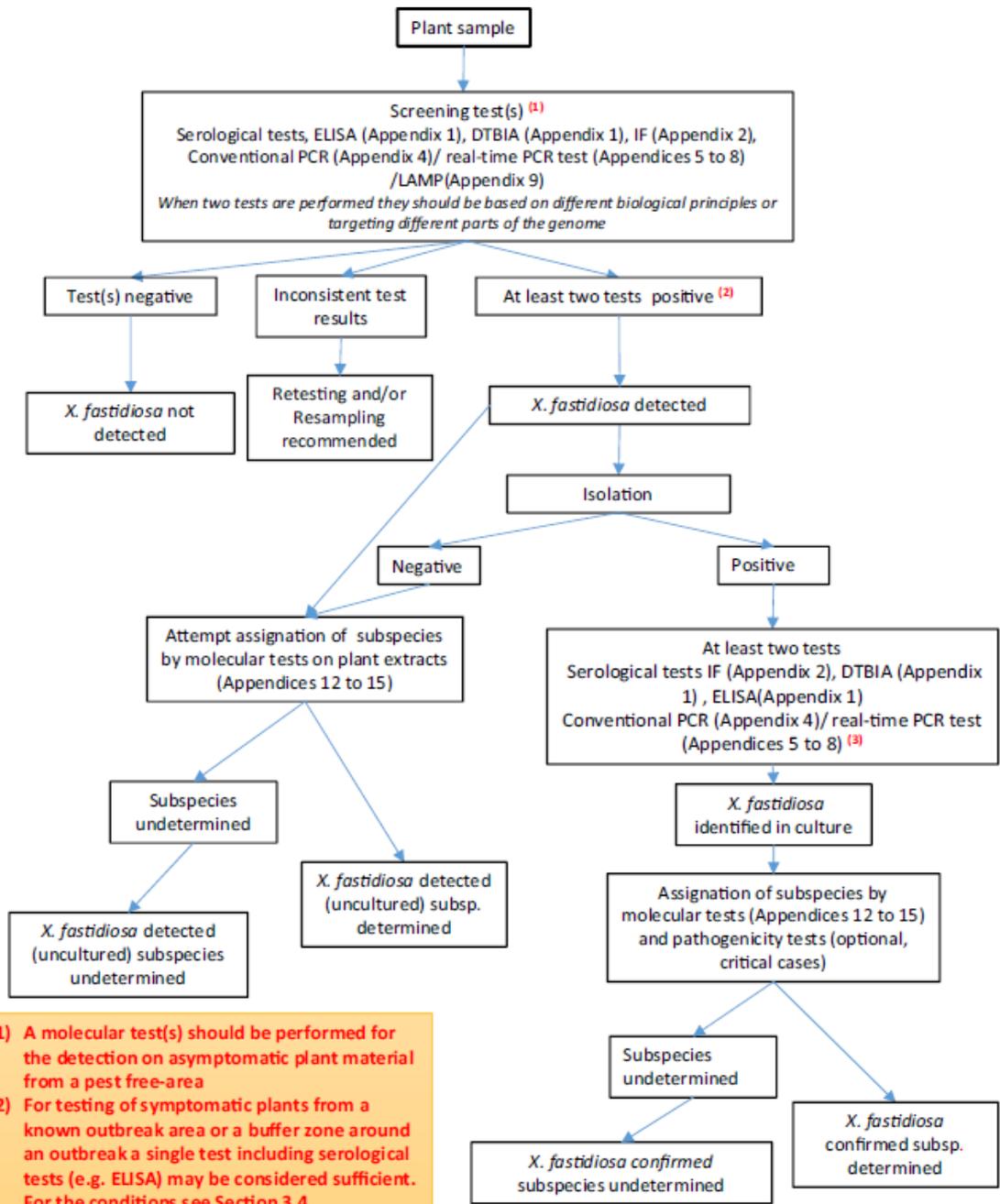
- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Diagrama de flujo para el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal (EPPO, 2018)



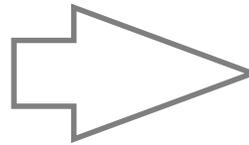
- (1) A molecular test(s) should be performed for the detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.4
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the identification of *X. fastidiosa*

Muestreo del material vegetal y preparación de la muestra en el laboratorio



Muestreo del material vegetal

Preparación de la muestra en el laboratorio



Muestreo del material vegetal y preparación de la muestra en el laboratorio



Muestreo del material vegetal

Preparación de la muestra en el laboratorio

- ❑ Las muestras se deben procesar lo antes posible cuando llegan al laboratorio



Muestreo del material vegetal y preparación de la muestra en el laboratorio



Muestreo del material vegetal

Preparación de la muestra en el laboratorio

- ❑ Las muestras se deben procesar lo antes posible cuando llegan al laboratorio
- ❑ Comprobar si hay insectos en las bolsas antes de abrirlas



Muestreo del material vegetal y preparación de la muestra en el laboratorio



Muestreo del material vegetal

Preparación de la muestra en el laboratorio

- ❑ Las muestras se deben procesar lo antes posible cuando llegan al laboratorio
- ❑ Comprobar si hay insectos en las bolsas antes de abrirlas
- ❑ Para el aislamiento, las muestras se pueden mantener refrigeradas hasta 3 días
- ❑ Para otras pruebas, las muestras se pueden mantener refrigeradas hasta 1 semana



Muestreo del material vegetal y preparación de la muestra en el laboratorio



Muestreo del material vegetal

Preparación de la muestra en el laboratorio

- ❑ Las muestras se deben procesar lo antes posible cuando llegan al laboratorio
- ❑ Comprobar si hay insectos en las bolsas antes de abrirlas
- ❑ Para el aislamiento, las muestras se pueden mantener refrigeradas hasta 3 días
- ❑ Para otras pruebas, las muestras se pueden mantener refrigeradas hasta 1 semana
- ❑ Seleccionar hojas sintomáticas. Si no hay síntomas, las hojas deberían ser representativas de toda la muestra



Muestreo del material vegetal y preparación de la muestra en el laboratorio



Muestreo del material vegetal

Preparación de la muestra en el laboratorio

Table 1. Number of leaves (including their petioles) or other plant material to be used and approximate weight of the laboratory sample

Type of sample	Host plants/type of tissue	Minimum no. of leaves per laboratory sample	Approximate weight of the laboratory sample
Samples from individual plants with leaves (symptomatic or asymptomatic)	Petioles and/or midribs of leaves of large size such as <i>Coffea</i> spp., <i>Ficus</i> spp., <i>Vitis</i> spp., <i>Nerium oleander</i>	5	0.5–1 g
	Petioles and/or midribs of leaves of small size such as <i>Polygala myrtifolia</i> and <i>Olea</i> spp.	25	0.5–1 g
	Plant species without petioles or with small petiole and midrib	25	0.5–1 g
Dormant plants (individual) or dormant cuttings	Xylem tissue	N.A.	0.5–1 g
Other cuttings	Stem	N.A.	1 g
Composite sample of asymptomatic plants from several plants (Bergsma-Vlami <i>et al.</i> , 2017; for coffee; Loconsole <i>et al.</i> , 2014 for olive; National Institute of Biology, SI, for other plants validation data is available in the EPPO Diagnostic Database) from a single lot of plants with leaves.	Samples collected from, e.g., imported consignments or nursery monitoring	100–200	Up to 10 g (per sample or subsample)

Muestreo del material vegetal y preparación de la muestra en el laboratorio



Muestreo del material vegetal

Preparación de la muestra en el laboratorio

Table 1. Number of leaves (including their petioles) or other plant material to be used and approximate weight of the laboratory sample

Type of sample	Host plants/type of tissue	Minimum no. of leaves per laboratory sample	Approximate weight of the laboratory sample
Samples from individual plants with leaves (symptomatic or asymptomatic)	Petioles and/or midribs of leaves of large size such as <i>Coffea</i> spp., <i>Ficus</i> spp., <i>Vitis</i> spp., <i>Nerium oleander</i>	5	0.5–1 g
	Petioles and/or midribs of leaves of small size such as <i>Polygala myrtifolia</i> and <i>Olea</i> spp.	25	0.5–1 g
	Plant species without petioles or with small petiole and midrib	25	0.5–1 g
Dormant plants (individual) or dormant cuttings	Xylem tissue	N.A.	0.5–1 g
Other cuttings	Stem	N.A.	1 g
Composite sample of asymptomatic plants from several plants (Bergsma-Vlami <i>et al.</i> , 2017; for coffee; Loconsole <i>et al.</i> , 2014 for olive; National Institute of Biology, SI, for other plants validation data is available in the EPPO Diagnostic Database) from a single lot of plants with leaves.	Samples collected from, e.g., imported consignments or nursery monitoring	100–200	Up to 10 g (per sample or subsample)



Muestreo y preparación de la muestra de vectores en el laboratorio



Toma de muestras

- ❑ Los vectores adultos deberían capturarse preferentemente con mangas entomológicas o aspiradores
- ❑ El muestreo se debe realizar principalmente desde el final de la primavera hasta el principio del otoño
- ❑ Si los insectos no se pueden procesar de modo inmediato, se deben almacenar en etanol 95–99% o a -20 ó -80°C

Preparación de la muestra en el laboratorio

Muestreo y preparación de la muestra de vectores en el laboratorio



Toma de muestras

- ❑ Los vectores adultos deberían capturarse preferentemente con mangas entomológicas o aspiradores
- ❑ El muestreo se debe realizar principalmente desde el final de la primavera hasta el principio del otoño
- ❑ Si los insectos no se pueden procesar de modo inmediato, se deben almacenar en etanol 95–99% o a -20 ó -80°C

Preparación de la muestra en el laboratorio

- ❑ Eliminar el solvente (etanol/acetona) y transferir los insectos durante unos minutos a papel de filtro



Muestreo y preparación de la muestra de vectores en el laboratorio



Toma de muestras

- ❑ Los vectores adultos deberían capturarse preferentemente con mangas entomológicas o aspiradores
- ❑ El muestreo se debe realizar principalmente desde el final de la primavera hasta el principio del otoño
- ❑ Si los insectos no se pueden procesar de modo inmediato, se deben almacenar en etanol 95–99% o a -20 ó -80°C

Preparación de la muestra en el laboratorio

- ❑ Utilizar solo la cabeza del insecto para la extracción de ADN

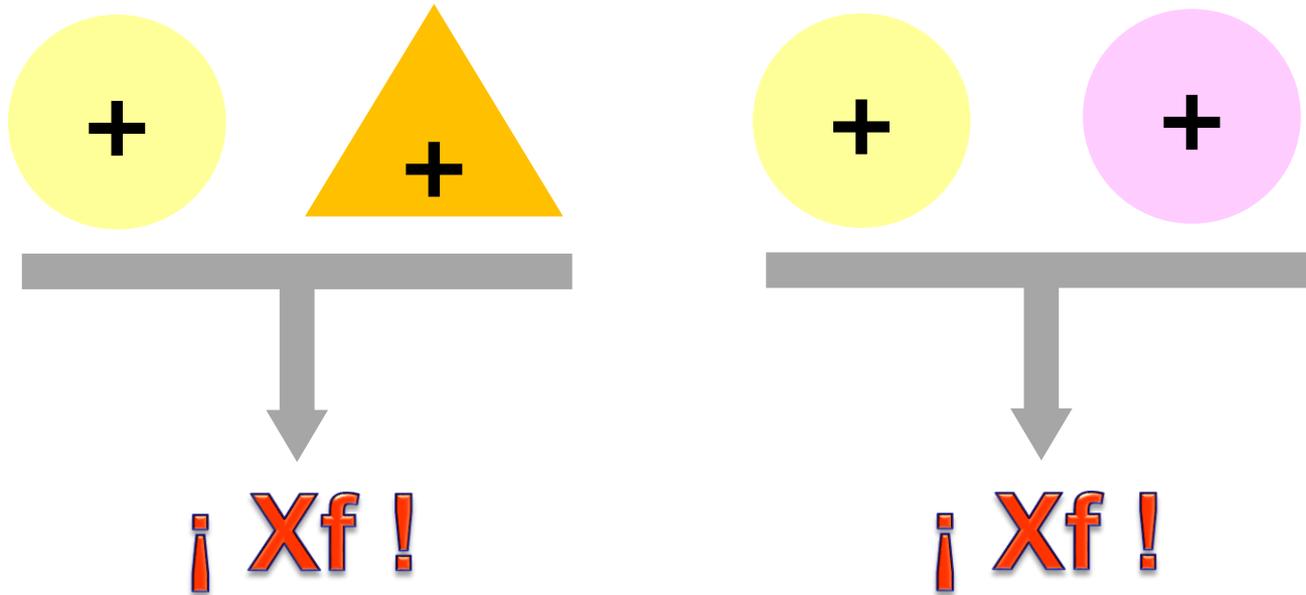


Pruebas de cribado (*Screening tests*)

- ❑ No se recomienda el aislamiento como prueba de cribado

Pruebas de cribado (*Screening tests*)

- ❑ No se recomienda el aislamiento como prueba de cribado
- ❑ Las muestras deben ser consideradas como 'muestras en las que se ha detectado *X. fastidiosa*' cuando sean positivas al menos dos pruebas de cribado basadas en diferentes principios biológicos o dirigidas a diferente partes del genoma



Pruebas de cribado (*Screening tests*)

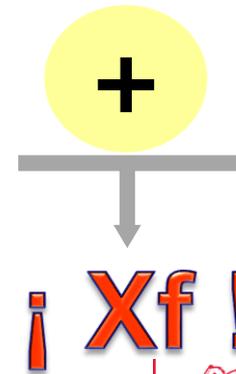
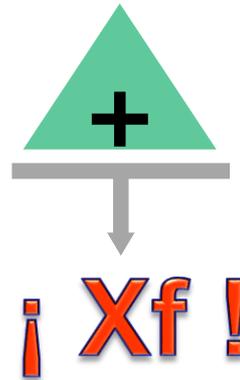
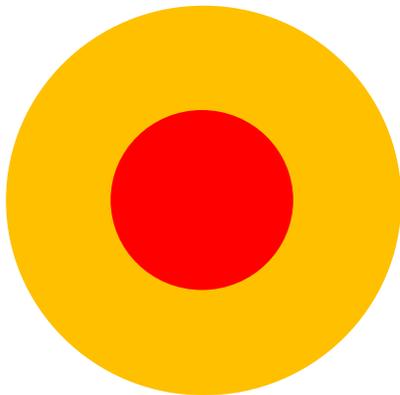
- ❑ No se recomienda el aislamiento como prueba de cribado
- ❑ Las muestras deben ser consideradas como 'muestras en las que se ha detectado *X. fastidiosa*' cuando sean positivas al menos dos pruebas de cribado basadas en diferentes principios biológicos o dirigidas a diferente partes del genoma
- ❑ La asignación de subespecie se debe realizar a continuación, mediante pruebas moleculares y/o análisis de secuencia

Pruebas de cribado (*Screening tests*)

- ❑ No se recomienda el aislamiento como prueba de cribado
- ❑ Las muestras deben ser consideradas como 'muestras en las que se ha detectado *X. fastidiosa*' cuando sean positivas al menos dos pruebas de cribado basadas en diferentes principios biológicos o dirigidas a diferente partes del genoma
- ❑ La asignación de subespecie se debe realizar a continuación, mediante pruebas moleculares y/o análisis de secuencia
- ❑ Se debe intentar el aislamiento

Pruebas de cribado (*Screening tests*)

- ❑ No se recomienda el aislamiento como prueba de cribado
- ❑ Las muestras deben ser consideradas como ‘muestras en las que se ha detectado *X. fastidiosa*’ cuando sean positivas al menos dos pruebas de cribado basadas en diferentes principios biológicos o dirigidas a diferente partes del genoma
- ❑ La asignación de subespecie se debe realizar a continuación, mediante pruebas moleculares y/o análisis de secuencia
- ❑ Se debe intentar el aislamiento
- ❑ En áreas infectadas o en zonas tampón, una sola prueba positiva es suficiente para considerar una muestra como ‘muestra en la que se ha detectado *X. fastidiosa*’



Pruebas de cribado (*Screening tests*)

- ❑ No se recomienda el aislamiento como prueba de cribado
- ❑ Las muestras deben ser consideradas como 'muestras en las que se ha detectado *X. fastidiosa*' cuando sean positivas al menos dos pruebas de cribado basadas en diferentes principios biológicos o dirigidas a diferente partes del genoma
- ❑ La asignación de subespecie se debe realizar a continuación, mediante pruebas moleculares y/o análisis de secuencia
- ❑ Se debe intentar el aislamiento
- ❑ En áreas infectadas o en zonas tampón, una sola prueba positiva es suficiente para considerar una muestra como 'muestra en la que se ha detectado *X. fastidiosa*'
- ❑ Si hay conflicto de resultados entre dos pruebas, se recomienda repetir las técnicas y/o remuestrear

Pruebas de cribado (*Screening tests*)

- ❑ No se recomienda el aislamiento como prueba de cribado
- ❑ Las muestras deben ser consideradas como ‘muestras en las que se ha detectado *X. fastidiosa*’ cuando sean positivas al menos dos pruebas de cribado basadas en diferentes principios biológicos o dirigidas a diferente partes del genoma
- ❑ La asignación de subespecie se debe realizar a continuación, mediante pruebas moleculares y/o análisis de secuencia
- ❑ Se debe intentar el aislamiento
- ❑ En áreas infectadas o en zonas tampón, una sola prueba positiva es suficiente para considerar una muestra como ‘muestra en la que se ha detectado *X. fastidiosa*’
- ❑ Si hay conflicto de resultados entre dos pruebas, se recomienda repetir las técnicas y/o remuestrear

Material vegetal sintomático

- ❑ Son adecuadas tanto las pruebas serológicas como las moleculares

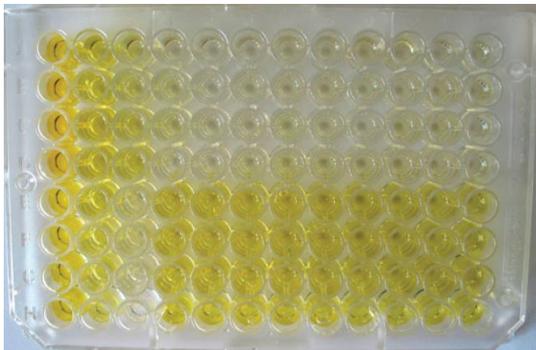
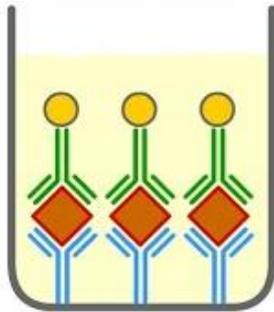
Material vegetal asintomático

- ❑ En área no infectada: pruebas moleculares
- ❑ En otras áreas: se puede realizar una sola prueba, y puede ser serológica

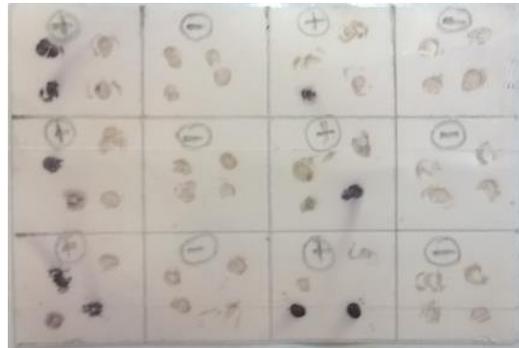
Pruebas de cribado (*Screening tests*)

Técnicas serológicas

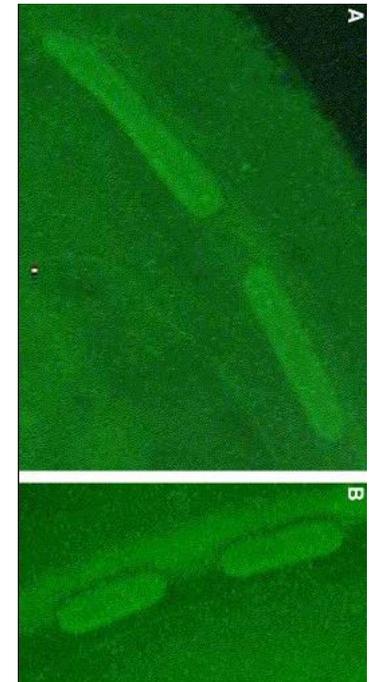
DAS-ELISA test
(*Double antibody sandwich*)



DTBIA
(*Direct tissue blot immunoassay*)



IF
(*Immunofluorescence*)



Pruebas de cribado (*Screening tests*)

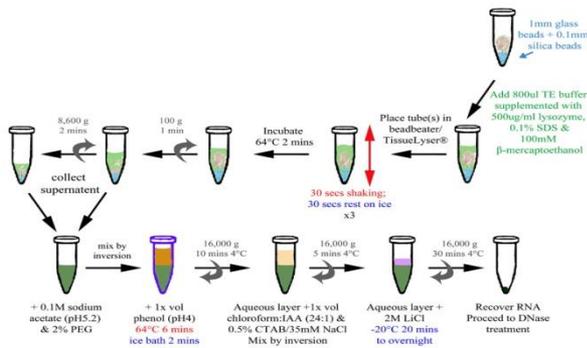
Técnicas serológicas

Técnicas moleculares

Requieren extracción de ADN



Extracción basada en CTAB



Estuches comerciales

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)



DNeasy Mericon™ Food Standard (Qiagen)



QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile)



Pruebas de cribado (*Screening tests*)

Técnicas serológicas

Técnicas moleculares

PCR convencional

Minsavage et al. (1994)

PCR en tiempo real

Harper et al. (2010;
erratum 2013)

Francis et al. (2006)

Ouyang et al. (2013)

Li et al. (2013)

LAMP

Pruebas de cribado (*Screening tests*)

Técnicas serológicas

Técnicas moleculares

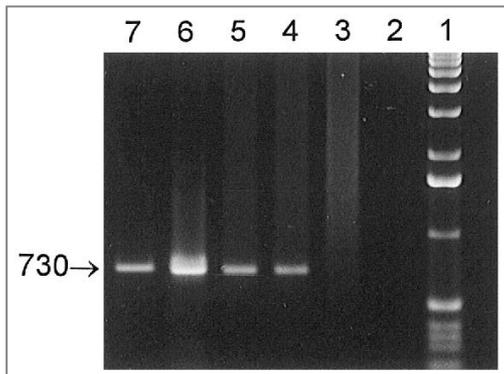
PCR convencional

PCR en tiempo real

LAMP

Minsavage et al. (1994)

▣ Secuencia diana en el gen *rpoD*



PCR en tiempo real

Harper et al. (2010; erratum 2013)

❑ Secuencia diana en el gen de la proteína **RimM**

Francis et al. (2006)

❑ Secuencia diana en el gen de la **proteína HL**

Ouyang et al. (2013)

❑ Secuencia diana en el gen de la **síntesis de cobalamina**

Li et al. (2013)

❑ Secuencia diana en el gen de la proteína **XF_r01**

CONTROLES

CONTROLES

CONTROL NEGATIVO DE AISLAMIENTO (NIC)

- ❑ Para controlar la contaminación durante la extracción del ácido nucleico
- ❑ Extracción de ADN y amplificación de matriz no infectada o de tampón



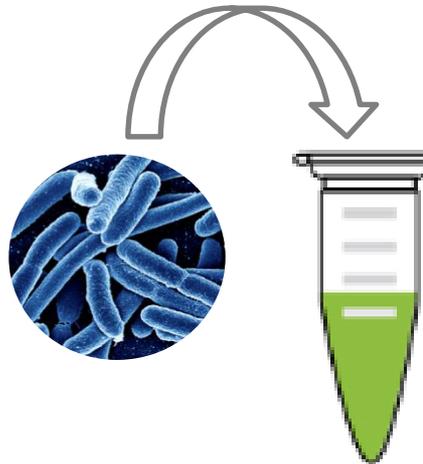
CONTROLES

CONTROL NEGATIVO DE AISLAMIENTO (NIC)

- ❑ Para controlar la contaminación durante la extracción del ácido nucleico
- ❑ Extracción de ADN y amplificación de matriz no infectada o de tampón

CONTROL POSITIVO DE AISLAMIENTO (PIC)

- ❑ Para asegurar que el ácido nucleico está en cantidad y calidad suficientes
- ❑ Extracción de ADN y amplificación de la misma matriz vegetal que se va a analizar pero inoculándole el organismo diana



CONTROLES

CONTROL NEGATIVO DE AISLAMIENTO (NIC)

- ❑ Para controlar la contaminación durante la extracción del ácido nucleico
- ❑ Extracción de ADN y amplificación de matriz no infectada o de tampón

CONTROL POSITIVO DE AISLAMIENTO (PIC)

- ❑ Para asegurar que el ácido nucleico está en cantidad y calidad suficientes
- ❑ Extracción de ADN y amplificación de la misma matriz vegetal que se va a analizar pero inoculándole el organismo diana

CONTROL NEGATIVO DE AMPLIFICACIÓN (NAC)

- ❑ Para descartar falsos positivos debidos a contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción
- ❑ Amplificación del agua que se emplea para preparar la mezcla de reacción



CONTROLES

CONTROL NEGATIVO DE AISLAMIENTO (NIC)

- ❑ Para controlar la contaminación durante la extracción del ácido nucleico
- ❑ Extracción de ADN y amplificación de matriz no infectada o de tampón

CONTROL POSITIVO DE AISLAMIENTO (PIC)

- ❑ Para asegurar que el ácido nucleico está en cantidad y calidad suficientes
- ❑ Extracción de ADN y amplificación de la misma matriz vegetal que se va a analizar pero inoculándole el organismo diana

CONTROL NEGATIVO DE AMPLIFICACIÓN (NAC)

- ❑ Para descartar falsos positivos debidos a contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción
- ❑ Amplificación del agua que se emplea para preparar la mezcla de reacción

CONTROL POSITIVO DE AMPLIFICACIÓN (PAC)

- ❑ Para controlar la eficiencia de la amplificación
- ❑ ADN de *X. fastidiosa*, aislado de una suspensión con aproximadamente 10^5 ufc/mL



PCR en tiempo real

Harper et al. (2010;
erratum 2013)

□ Secuencia diana en el gen de la proteína **RimM**

Francis et al.
(2006)

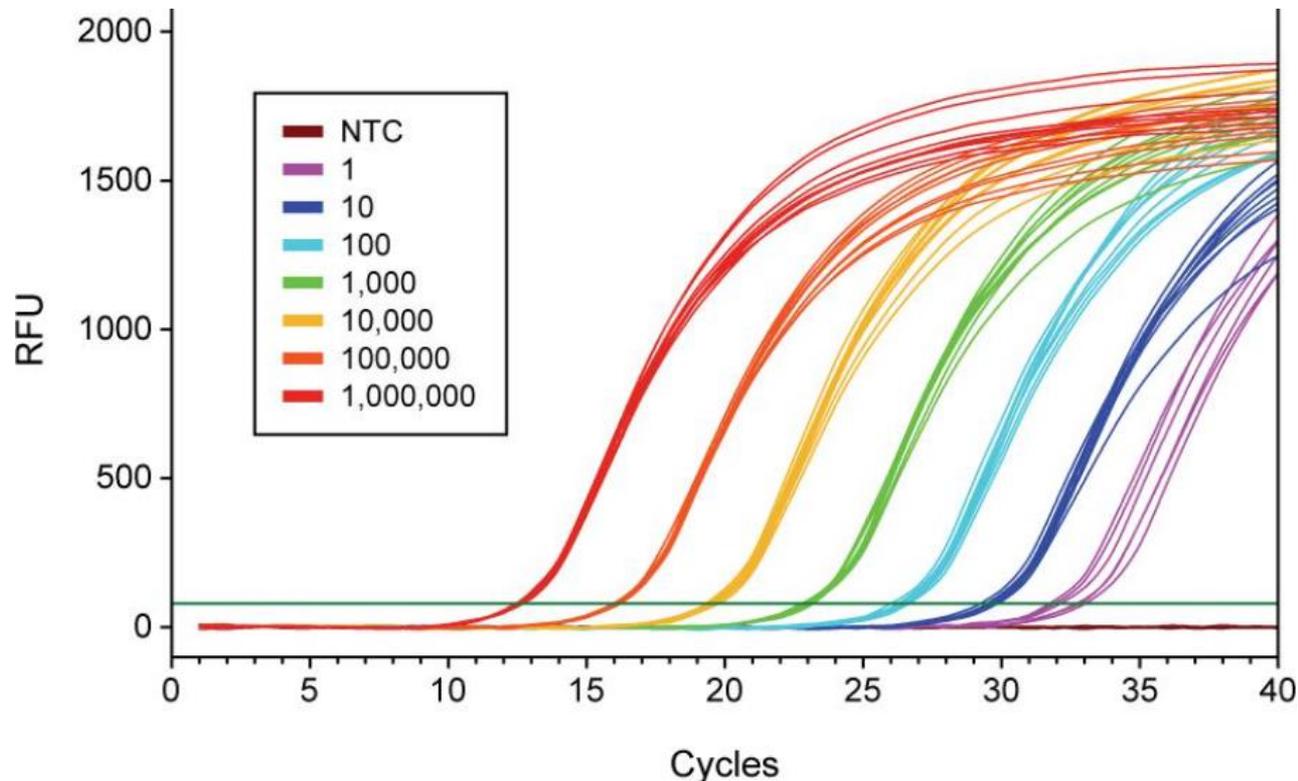
□ Secuencia diana en el gen de la proteína **HL**

Ouyang et al.
(2013)

□ Secuencia diana en el gen de la **síntesis de cobalamina**

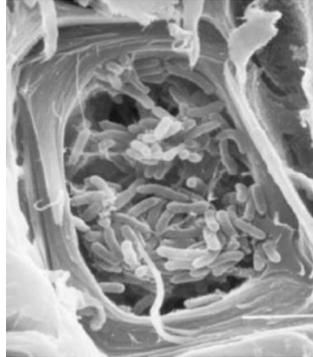
Li et al.
(2013)

□ Secuencia diana en el gen de la proteína **XF_r01**

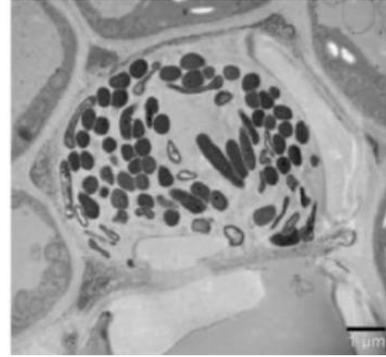


Pruebas adicionales

Microscopía electrónica



Lima et al., 1998. Plant Disease 82(1): 94-97



Bergsma-Vlami et al. 2017. Plant Pathology DOI: 10.1111/ppa.12696

Aislamiento

- ❑ *X. fastidiosa* requiere medios específicos:
 - ❑ PD2 (Davis et al., 1980)
 - ❑ BCYE (Wells et al., 1981)
 - ❑ PWG (modificado después de Hill & Purcell, 1995)

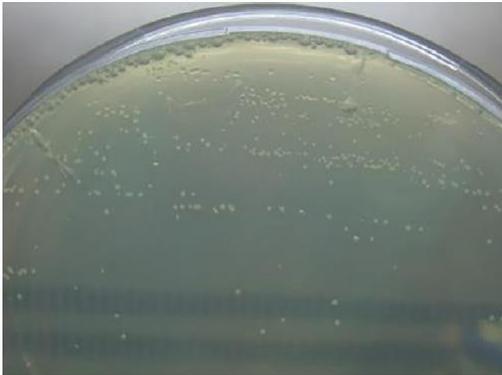


Fig. 23 Colonies of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* on PD2 (size < 2 mm after 3 weeks).



Fig. 24 Collection strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC 35879 on BCYE (size < 2 mm after 3 weeks).

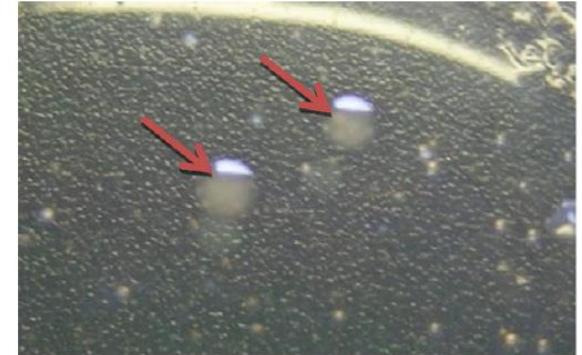


Fig. 27 *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* isolated from *Coffea arabica* on modified PWG (size < 2 mm after 3 weeks) (the background is a sheet of black paper below the plate). Courtesy Anses.

Aislamiento

❑ *X. fastidiosa* requiere medios específicos:

❑ PD2 (Davis et al., 1980)

❑ BCYE (Wells et al., 1981)

❑ PWG (modificado después de Hill & Purcell, 1995)

❑ Se recomienda el uso de al menos dos medios diferentes

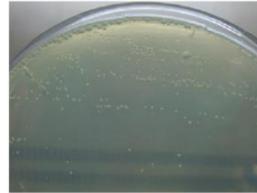


Fig. 23 Colonies of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* on PD2 (size < 2 mm after 3 weeks).



Fig. 24 Collection strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC 35879 on BCYE (size < 2 mm after 3 weeks).

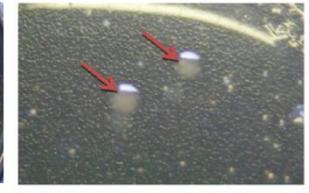


Fig. 27 *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* isolated from *Coffea arabica* on modified PWG (size < 2 mm after 3 weeks) (the background is a sheet of black paper below the plate). Courtesy Ames.

Aislamiento

❑ *X. fastidiosa* requiere medios específicos:

❑ PD2 (Davis et al., 1980)

❑ BCYE (Wells et al., 1981)

❑ PWG (modificado después de Hill & Purcell, 1995)

❑ Se recomienda el uso de al menos dos medios diferentes

❑ Desinfectar la superficie de la muestra para evitar el crecimiento de saprofitos (*X. fastidiosa* crece muy lentamente, sus colonias pueden tardar hasta 28 días en ser visibles)



Fig. 23 Colonies of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* on PD2 (size < 2 mm after 3 weeks).



Fig. 24 Collection strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC 35879 on BCYE (size < 2 mm after 3 weeks).

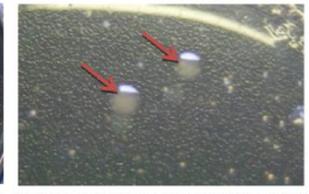
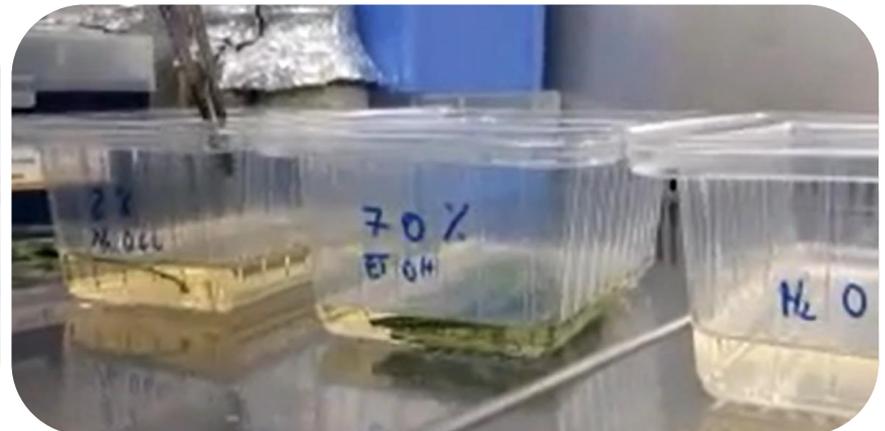


Fig. 27 *Xylella fastidiosa* subsp. *paucis* isolated from *Coffea arabica* on modified PWG (size < 2 mm after 3 weeks) (the background is a sheet of black paper below the plate). Courtesy Ames.



Aislamiento

❑ *X. fastidiosa* requiere medios específicos:

❑ PD2 (Davis et al., 1980)

❑ BCYE (Wells et al., 1981)

❑ PWG (modificado después de Hill & Purcell, 1995)

❑ Se recomienda el uso de al menos dos medios diferentes

❑ Desinfectar la superficie de la muestra para evitar el crecimiento de saprofitos (*X. fastidiosa* crece muy lentamente, sus colonias pueden tardar hasta 28 días en ser visibles)

❑ Las colonias son pequeñas, de 1–1.5 mm de diámetro después de 1–3 semanas de incubación a unos 28°C, circulares, de borde liso y ligeramente convexas

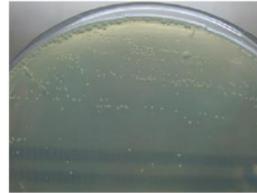


Fig. 23 Colonies of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* on PD2 (size < 2 mm after 3 weeks).



Fig. 24 Collection strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC 35879 on BCYE (size < 2 mm after 3 weeks).

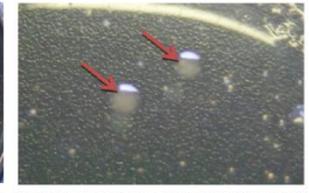


Fig. 27 *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* isolated from *Coffea arabica* on modified PWG (size < 2 mm after 3 weeks) (the background is a sheet of black paper below the plate). Courtesy Ames.

Aislamiento

❑ *X. fastidiosa* requiere medios específicos:

❑ PD2 (Davis et al., 1980)

❑ BCYE (Wells et al., 1981)

❑ PWG (modificado después de Hill & Purcell, 1995)

❑ Se recomienda el uso de al menos dos medios diferentes

❑ Desinfectar la superficie de la muestra para evitar el crecimiento de saprofitos (*X. fastidiosa* crece muy lentamente, sus colonias pueden tardar hasta 28 días en ser visibles)

❑ Las colonias son pequeñas, de 1–1.5 mm de diámetro después de 1–3 semanas de incubación a unos 28°C, circulares, de borde liso y ligeramente convexas

❑ Las placas se deben sellar o mantener en bolsas de plástico para evitar la desecación durante la incubación



Fig. 23 Colonies of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* on PD2 (size < 2 mm after 3 weeks).



Fig. 24 Collection strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC 35879 on BCYE (size < 2 mm after 3 weeks).

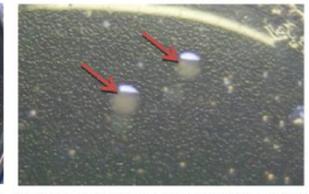
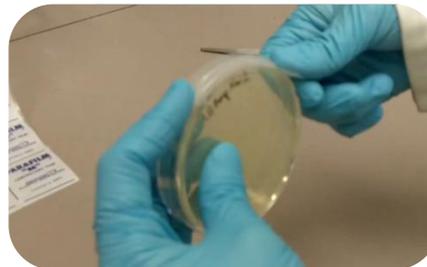


Fig. 27 *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* isolated from *Coffea arabica* on modified PWG (size < 2 mm after 3 weeks) (the background is a sheet of black paper below the plate). Courtesy Ames.



Aislamiento

❑ *X. fastidiosa* requiere medios específicos:

❑ PD2 (Davis et al., 1980)

❑ BCYE (Wells et al., 1981)

❑ PWG (modificado después de Hill & Purcell, 1995)

❑ Se recomienda el uso de al menos dos medios diferentes

❑ Desinfectar la superficie de la muestra para evitar el crecimiento de saprofitos (*X. fastidiosa* crece muy lentamente, sus colonias pueden tardar hasta 28 días en ser visibles)

❑ Las colonias son pequeñas, de 1–1.5 mm de diámetro después de 1–3 semanas de incubación a unos 28°C, circulares, de borde liso y ligeramente convexas

❑ Las placas se deben sellar o mantener en bolsas de plástico para evitar la desecación durante la incubación

❑ Las colonias pueden verse después de 2–3 semanas, pero las placas deben observarse durante 6 semanas



Fig. 23 Colonies of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* on PD2 (size < 2 mm after 3 weeks).



Fig. 24 Collection strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC 35879 on BCYE (size < 2 mm after 3 weeks).

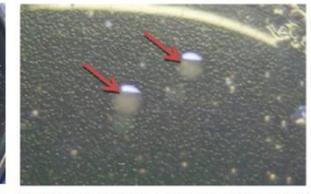


Fig. 27 *Xylella fastidiosa* subsp. *paucica* isolated from *Coffea arabica* on modified PWG (size < 2 mm after 3 weeks) (the background is a sheet of black paper below the plate). Courtesy Ames.

Aislamiento

❑ *X. fastidiosa* requiere medios específicos:

❑ PD2 (Davis et al., 1980)

❑ BCYE (Wells et al., 1981)

❑ PWG (modificado después de Hill & Purcell, 1995)

❑ Se recomienda el uso de al menos dos medios diferentes

❑ Desinfectar la superficie de la muestra para evitar el crecimiento de saprofitos (*X. fastidiosa* crece muy lentamente, sus colonias pueden tardar hasta 28 días en ser visibles)

❑ Las colonias son pequeñas, de 1–1.5 mm de diámetro después de 1–3 semanas de incubación a unos 28°C, circulares, de borde liso y ligeramente convexas

❑ Las placas se deben sellar o mantener en bolsas de plástico para evitar la desecación durante la incubación

❑ Las colonias pueden verse después de 2–3 semanas, pero las placas deben observarse durante 6 semanas

❑ Las colonias se deben identificar como *X. fastidiosa* mediante pruebas serológicas o moleculares

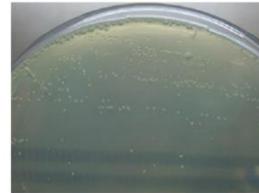


Fig. 23 Colonies of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* on PD2 (size < 2 mm after 3 weeks).



Fig. 24 Collection strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC 35879 on BCYE (size < 2 mm after 3 weeks).

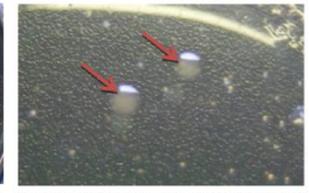


Fig. 27 *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* isolated from *Coffea arabica* on modified PWG (size < 2 mm after 3 weeks) (the background is a sheet of black paper below the plate). Courtesy Ames.

Identificación de los cultivos puros de *X. fastidiosa*

Pruebas serológicas: ELISA, IF

Pruebas moleculares: PCR convencional, PCR en tiempo real

Pruebas moleculares para la identificación de *X. fastidiosa* y la asignación de subespecie

Identificación y determinación de la subespecie

Pruebas moleculares para la identificación de *X. fastidiosa* y la asignación de subespecie

El **MLST** (*multilocus sequence typing*) está recomendado para la asignación de subespecie a las nuevas identificaciones (nuevos brotes, nuevos hospedadores)

MLST of *Xylella fastidiosa*

Genes

The MLST for *Xylella fastidiosa* scheme uses internal fragments of the following seven house-keeping genes:

Gene	Gene Function	Biochemical Function	Temecula (PD0001) Gene Position	M12 (ALS0299) Gene Position	9a5c (CVC0018) Gene Position
<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	amino acid biosynthesis	PD1047	Xfasm_1205	XF1818
<i>petC</i>	ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, cytochrome C1 subunit	electron transport	PD1775	Xfasm_1943	XF0910
<i>malF</i>	ABC transporter sugar permease	transport of carbohydrates	PD1465	Xfasm12_1606	XF2447
<i>cysG</i>	siroheme synthase	biosynthesis of heme, porphyrin	PD1840	Xfasm12_2018	XF0832
<i>hoIc</i>	DNA polymerase III holoenzyme, chi subunit	replication	PD0104	Xfasm12_0112	XF0136
<i>nuoL</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO12 subunit	aerobic respiration	PD0259	Xfasm12_0280	XF0316
<i>gltT</i>	glutamate symport protein	transport of amino acids	PD1516	Xfasm12_1656	XF0656

PCR Primers

The following primers are used for both PCR and sequencing:

Gene	Primer Sequences	Amplicon ^a Length (bp)
<i>leuA</i>	for - 5' GGTGC ACGCC AAATC GAATG 3' rev - 5' GTATC GTTGT GGCCT AACT G 3'	708
<i>petC</i>	for - 5' GCTGC CATTG GTTGA AGTAC CT 3' rev - 5' GCACG TCCTC CCAAT AAGCC T 3'	533
<i>malF</i>	for - 5' TTGC TGGT CCTG CCGT GTTG 3' rev - 5' GACAGCAGAAGCACGTCCAGAT 3'	730
<i>cysG</i>	for - 5' GCCGA AGCAG TGCTG GAA G 3' rev - 5' GCCAT TTTTCG ATCAG TGCAA AAG 3'	600 ^b
<i>hoIc</i>	for - 5' ATGGC ACGCG CCGAC TTCT 3' rev - 5' ATGTC GTGTT TGTTT ATGTG CAGG 3'	379
<i>nuoL</i>	for - 5' TAGCG ACTTA CGGTT ACTGG GC 3' rev - 5' ACCAC CGATC CACAA CGCAT 3'	557 ^c
<i>gltT</i>	for - 5' TCATG ATCCA AATCA CTCGC TT 3' rev - 5' ACTGG ACGCT GCCTC GTA AA CC 3'	654

^a Amplicon length with primers removed.

^b A 6bp indel appears in some isolates.

^c A 30bp indel appears in some isolates.

Identificación y determinación de la subespecie

Pruebas moleculares para la identificación de *X. fastidiosa* y la asignación de subespecie

El **MLST** (*multilocus sequence typing*) está recomendado para la asignación de subespecie a los nuevas identificaciones (nuevos brotes, nuevos hospedadores)

Hay **marcadores moleculares específicos de subespecie** (Pooler & Hartung, 1995; Hernandez-Martinez et al., 2006)

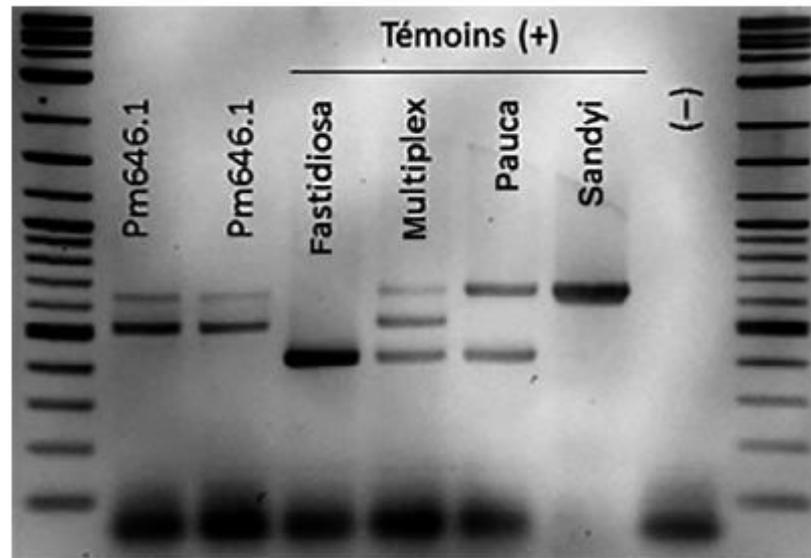


Fig. 28 Samples of *Polygala myrtifolia* and positive controls (subspecies of strains).

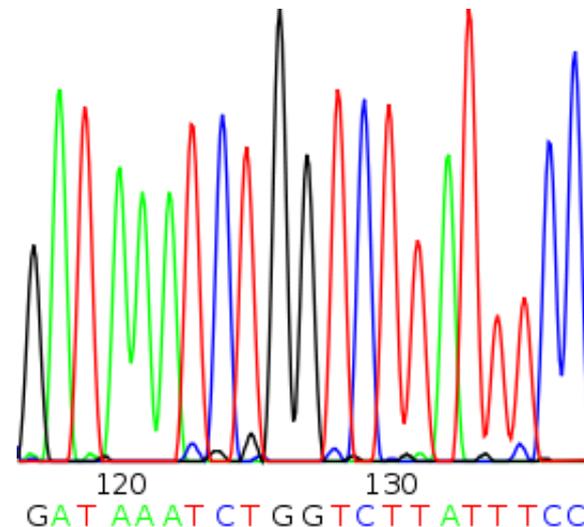
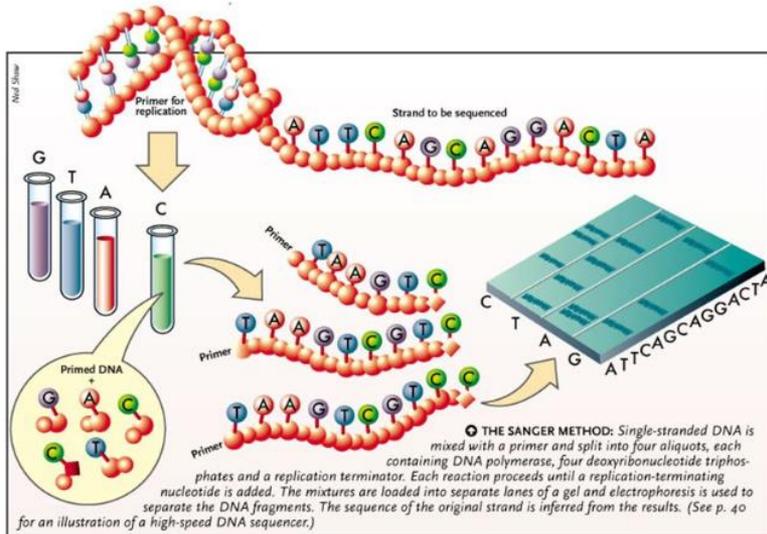
Identificación y determinación de la subespecie

Pruebas moleculares para la identificación de *X. fastidiosa* y la asignación de subespecie

El **MLST** (*multilocus sequence typing*) está recomendado para la asignación de subespecie a los nuevas identificaciones (nuevos brotes, nuevos hospedadores)

Hay **marcadores moleculares específicos de subespecie** (Pooler & Hartung, 1995; Hernandez-Martinez et al., 2006)

Se requiere la **secuenciación** del producto de PCR de al menos dos genes de mantenimiento como *rpoD* y genes del MLST como *malF* o *cysG* en ambas direcciones



Identificación y determinación de la subespecie

Pruebas moleculares para la identificación de *X. fastidiosa* y la asignación de subespecie

El **MLST** (*multilocus sequence typing*) está recomendado para la asignación de subespecie a las nuevas identificaciones (nuevos brotes, nuevos hospedadores)

Hay **marcadores moleculares específicos de subespecie** (Pooler & Hartung, 1995; Hernandez-Martinez et al., 2006)

Se requiere la **secuenciación** del producto de PCR de al menos dos genes de mantenimiento como *rpoD* y genes del MLST como *malF* o *cysG* en ambas direcciones

❑ Estas pruebas se han desarrollado principalmente para cultivos puros, pero pueden emplearse con extractos de ADN obtenidos de planta o insecto (excepto la PCR múltiple de Hernandez-Martinez et al., 2006)



Pruebas moleculares para la identificación de *X. fastidiosa* y la asignación de subespecie

El **MLST** (*multilocus sequence typing*) está recomendado para la asignación de subespecie a las nuevas identificaciones (nuevos brotes, nuevos hospedadores)

Hay **marcadores moleculares específicos de subespecie** (Pooler & Hartung, 1995; Hernandez-Martinez et al., 2006)

Se requiere la **secuenciación** del producto de PCR de al menos dos genes de mantenimiento como *rpoD* y genes del MLST como *malF* o *cysG* en ambas direcciones

- ❑ Estas pruebas se han desarrollado principalmente para cultivos puros, pero pueden emplearse con extractos de ADN obtenidos de planta o insecto (excepto la PCR múltiple de Hernandez-Martinez et al., 2006)
- ❑ La cantidad y calidad del ADN diana o la presencia de infecciones mixtas puede impedir la obtención de todos los amplicones o una asignación clara a una subespecie

Pruebas moleculares para la identificación de *X. fastidiosa* y la asignación de subespecie

El **MLST** (*multilocus sequence typing*) está recomendado para la asignación de subespecie a las nuevas identificaciones (nuevos brotes, nuevos hospedadores)

Hay **marcadores moleculares específicos de subespecie** (Pooler & Hartung, 1995; Hernandez-Martinez et al., 2006)

Se requiere la **secuenciación** del producto de PCR de al menos dos genes de mantenimiento como *rpoD* y genes del MLST como *malF* o *cysG* en ambas direcciones

- ❑ Estas pruebas se han desarrollado principalmente para cultivos puros, pero pueden emplearse con extractos de ADN obtenidos de planta o insecto (excepto la PCR múltiple de Hernandez-Martinez et al., 2006)
- ❑ La cantidad y calidad del ADN diana o la presencia de infecciones mixtas puede impedir la obtención de todos los amplicones o una asignación clara a una subespecie
- ❑ Es más difícil en el caso de insectos que de plantas, debido a la baja concentración de bacterias y la limitada cantidad de ADN a partir de un solo insecto

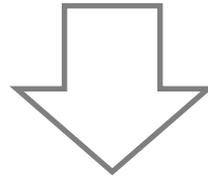
DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2015/789 DE LA COMISIÓN

de 18 de mayo de 2015

sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la Unión de *Xylella fastidiosa*
(Wells et al.)

[notificada con el número C(2015) 3415]

(DO L 125 de 21.5.2015, p. 36)



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY

Brussels, 15.12.2017

**COMMISSION DATABASE OF VALIDATED TESTS FOR THE IDENTIFICATION
OF THE XYLELLA FASTIDIOSA AND ITS SUBSPECIES AS REFERRED TO IN
ARTICLE 3(2) OF COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2015/789**

DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2015/789 DE LA COMISIÓN

de 18 de mayo de 2015

sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la Unión de *Xylella fastidiosa* (Wells et al.)

[notificada con el número C(2015) 3415]

(DO L 125 de 21.5.2015, p. 36)



Artículo 3

Inspecciones del organismo especificado en el territorio de los Estados miembros e identificación

2. Se efectuará una prueba molecular para detectar la presencia del organismo especificado en zonas distintas de las demarcadas y, en caso de resultados positivos, se identificará su presencia, de acuerdo con las normas internacionales, con al menos una prueba molecular positiva adicional. Estas pruebas, que se incluirán en la base de datos de la Comisión sobre pruebas de identificación del organismo especificado y sus subespecies, estarán dirigidas a distintas partes del genoma.

DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2015/789 DE LA COMISIÓN

de 18 de mayo de 2015

sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la Unión de *Xylella fastidiosa* (Wells et al.)

[notificada con el número C(2015) 3415]

(DO L 125 de 21.5.2015, p. 36)



Artículo 3

Inspecciones del organismo especificado en el territorio de los Estados miembros e identificación

2. Se efectuará una prueba molecular para detectar la presencia del organismo especificado en zonas distintas de las demarcadas y, en caso de resultados positivos, se identificará su presencia, de acuerdo con las normas internacionales, con al menos una prueba molecular positiva adicional. Estas pruebas, que se incluirán en la base de datos de la Comisión sobre pruebas de identificación del organismo especificado y sus subespecies, estarán dirigidas a distintas partes del genoma.

Se efectuará una prueba para detectar la presencia del organismo especificado en zonas demarcadas y, en caso de resultados positivos, se identificará su presencia, de acuerdo con las normas internacionales, con al menos una prueba molecular positiva. Estas pruebas se incluirán en la base de datos de la Comisión sobre pruebas de identificación del organismo especificado y sus subespecies.



COMMISSION DATABASE OF VALIDATED TESTS FOR THE IDENTIFICATION OF THE *XYLELLA FASTIDIOSA* AND ITS SUBSPECIES AS REFERRED TO IN ARTICLE 3(2) OF COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2015/789

A. Tests for the screening and identification of the presence of *Xylella fastidiosa*

1. In Demarcated Areas and sites of production referred to in Article 9(8) of Decision 2015/789

- [Conventional Polymerase Chain Reaction \(PCR\)](#) based on [Minsavage *et al.*, 1994\(*\)](#);
- [Real time PCR](#) based on [Francis *et al.*, 2006\(*\)](#);
- [Real time PCR](#) based on [Harper *et al.*, 2010 \(and erratum 2013\)](#);
- [Loop-mediated isothermal amplification \(LAMP\)](#) based on primers developed by [Harper *et al.* \(2010, erratum 2013\)](#);
- [Enzyme Linked Immunosorbent Assay \(ELISA\)](#), using polyclonal antibodies able to identify all subspecies of the specified organism;
- [Immunofluorescence \(IF\)](#), using polyclonal antibodies able to identify all subspecies of the specified organism;

2. In areas other than Demarcated Areas and in sites of production other than the ones referred to in Article 9(8) of Decision 2015/789

- [Real time PCR](#) based on [Harper *et al.*, 2010 \(and erratum 2013\)](#);
- [Loop-mediated isothermal amplification \(LAMP\)](#) based on primers developed by [Harper *et al.* \(2010, erratum 2013\)](#).

B. Molecular tests for the identification of the subspecies of *Xylella fastidiosa*

- [Multi Locus Sequence Typing \(MLST\)](#) based on [Yuan *et al.*, 2010](#) determining all subspecies;
- [PCR](#) based on [Hernandez-Martinez *et al.*, 2006](#) determining the subspecies *fastidiosa*, *multiplex* and *sandyi*;
- [PCR](#) based on [Pooler & Hartung 1995](#) determining the subspecies *pauca*.

CONCLUSIONES

- La detección de *X. fastidiosa* se ve dificultada por su lento crecimiento y sus requerimientos particulares, su capacidad de producir infecciones latentes y su distribución heterogénea en la planta.
- La EPPO recomienda diferentes técnicas serológicas y moleculares para un cribado rápido de las muestras a analizar, y define criterios para determinar qué pruebas utilizar según la zona en la que se apliquen.
- Las técnicas difieren en especificidad y sensibilidad, pero todas ellas permiten detectar la bacteria, aunque su límite puede estar por encima de la población diana.
- La Comisión Europea dispone de una base de datos de técnicas validadas para utilizar según la zona en la que se apliquen (más restringida que las de la EPPO).



**Muchas gracias por
su atención**

