

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

DETECCIÓN, DISPERSIÓN Y MUESTREO EN LA ERRADICACIÓN DEL *Citrus tristeza virus* EN PLANTACIONES COMERCIALES DE CITRICOS

NOE RUIZ GARCÍA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO


2008

La presente tesis titulada: **Detección, dispersión y muestreo en la erradicación del *Citrus tristeza virus* en plantaciones comerciales de cítricos**, realizada por el alumno: **Noe Ruiz García**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGIA**

CONSEJO PARTICULAR

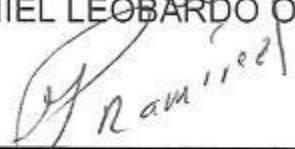
CONSEJERO:


DR. GUSTAVO MORA AGUILERA

ASESOR:


DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTÍNEZ

ASESOR:


DR. GUSTAVO RAMÍREZ VALVERDE

ASESOR:


DR. ANTONIO MORA AGUILERA

ASESOR:


DR. SAMI JORGE MICHEREFF

Montecillo, Texcoco, México, enero de 2008

DETECCIÓN, DISPERSIÓN Y MUESTREO EN LA ERRADICACIÓN DEL *Citrus tristeza virus* EN PLANTACIONES COMERCIALES DE CITRICOS

Noe Ruiz García, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2008

RESUMEN

La dispersión espacio-temporal del *Citrus tristeza virus* se caracterizó en Tamaulipas de diciembre de 2001 a marzo de 2004, en 11 huertos comerciales de naranja dulce injertados en naranjo agrio. Adicionalmente, se comparó el desempeño de la técnica serológica inmunopresión-ELISA con respecto a DAS-ELISA propuesta en la normatividad oficial mexicana de la Campaña Nacional contra CTV. El objetivo fue proporcionar bases epidemiológicas e incorporar criterios de diagnóstico viral en una propuesta de muestreo con fines de erradicación. Inmunopresión-ELISA fue tan confiable (97.8 %) como DAS-ELISA en identificar árboles positivos, siendo 54.9% más económica e implicó solo una sexta parte del tiempo de procesado. La detectabilidad en impresiones repetidas por pecíolo tuvo una reproducibilidad de 93.2%. La disposición de brotes positivos alrededor del árbol se ajustó a una distribución beta binomial ($p < 0.16$) lo que implica una distribución heterogénea del virus. Con base en esta distribución y la probabilidad de un brote positivo, el tamaño de muestra óptimo por árbol fue de cinco brotes en impresión doble. Considerando la reproducibilidad, se propone el uso de inmunopresión-ELISA en impresión simple de 10 pecíolos foliares seleccionados del dosel externo del árbol. La dispersión anual de CTV en huertas con una incidencia inicial de 1-5.4% fue 0.2-3.4%. En 82 % de los nuevos focos, la dispersión viral ocurrió en dependencias continuas de dos hileras y tres árboles dentro del surco. La aplicación de la forma de dispersión del CTV en el diseño de esquemas de muestreo sistemático con número variable de unidades (árboles) de muestreo simple y compuesta evidenció que el menor sesgo (<5%) en la estimación de la incidencia de tristeza, a través de simulación Monte Carlo, se obtuvo con unidades compuestas rectangulares orientados dentro de hilera de 1x2 y 2x3 árboles y una muestra del 5 a 10 % de la población. Con cuadrantes orientados entre hileras de 2x1, 2x2 y 3x2, se requirió una muestra de 12.5 a 15% para niveles de sesgo comparativos. Unidades compuestas de 3x3, 3x4 y 4x3 tuvieron los mayores sesgos. El muestreo de árboles individuales fue aparentemente adecuado para patrones espaciales con incidencias menores a 2 % pero requirió un tamaño de muestra amplio entre 5 y 15% para una sesgo aceptable (<5%) probablemente debido al patrón aleatorio de focos iniciales.

Palabras clave: *Citrus tristeza virus*, serología, muestreo, vectores, epidemiología.

DETECTION, SPREAD AND SAMPLING IN THE ERRADICATION OF *Citrus tristeza virus* IN COMMERCIAL ORCHARDS OF CITRUS

Noe Ruiz García, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2008

ABSTRACT

The spatial-temporal dispersion of *Citrus tristeza virus* (CTV) was characterized from December 2001 to March 2004 in 11 commercial orchards of sweet orange grafted on sour orange. Also, the performance of direct tissue blot-ELISA was compared with respect to DAS-ELISA which is included in the Mexican regulation as the serological diagnosis technique to be use in the National Campaign against the CTV. The objective was to provide epidemiological bases and viral diagnosis criteria onto a sampling system for eradication purposes. Direct tissue blot-ELISA was reliable (97.8 %) as DAS-ELISA for positive detection being 54.9 % cheaper and six times faster in the overall processing time. The reproducibility of detection in two repetitive prints per petiole was 93.2%. The allocation of positive shoots on the tree canopy was fitted to a beta binomial distribution ($p < 0.16$) indicating a heterogeneous viral distribution. Base on this distribution and the probability to detect a positive shoot, the optimal sample size per tree was five shoots in double printing. Considering the reproducibility, Direct tissue blot-ELISA using single printings of 10 leaf petioles selected from the external tree canopy is proposed to be adopted. Te annual spread of CTV in orchards with initial incidence of 1-5.4% was 0.2-3.4%. In 82% of new foci, virus spread occurred within two rows and three trees within rows. The consideration of the CTV focus dispersion path in systematic sampling designs using single and multiple tree-units showed through Monte Carlo simulation that less bias on the estimation of tristeza incidence was obtained with multiple units of 1x2 and 2x3 trees fashioned in quadrates oriented toward rows over a sampling size of 5 to 10% of the population. With 2x1, 2x2 and 3x2 quadrates oriented across rows it was required a sampling size of 12.5 to 15% to obtain comparative bias values. The highest bias was obtained with 3x3, 3x4 and 4x3 quadrates. Single tree-units was apparently more adequate for sampling spatial pattern with less than 2% of incidence but requiring broader sampling sizes between 5 to 15% of the population for an acceptable bias (<5%) probably due to the random pattern of initial foci.

Key words: *Citrus tristeza virus*, serology, sampling, vectors, epidemiology.

DEDICATORIA

*A mi esposa e hija
Carolina y Yetzil*

Con todo mi amor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, en particular al Programa de Fitopatología, por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

A mi Consejo Particular:

Dr. Gustavo Mora Aguilera, por su paciencia, valiosa dirección y apoyo que proporcionó en todo momento para el logro de este trabajo y en mi formación académica.

Al Dr. Daniel Ochoa, Dr. Gustavo Valverde, Dr. Antonio Mora y Dr. Sami Michereff, por su valioso apoyo, acertadas sugerencias y comentarios durante la realización de este trabajo.

A cada uno de los profesores de quienes en las distintas áreas de estudio he recibido parte de su conocimiento para mi preparación.

Al personal del Comité para el Fomento e Investigación Citrícola del Estado de Tamaulipas (CFICET), Campo Experimental “General Francisco Villa”, Unión Agrícola Regional de Citricultores de Tamaulipas (UARCT) y Fundación Produce Tamaulipas A. C., por el financiamiento y apoyo recibido durante la realización del presente trabajo.

Al personal de la Campaña contra el Virus de la Tristeza de los Cítricos del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tamaulipas, por el apoyo logístico en la toma de las muestras y procesado de las mismas.

A todos mis compañeros, amigos y personas que me apoyaron desinteresadamente en la realización del presente trabajo.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	
1. Planteamiento del problema.....	2
2. Hipótesis.....	4
3. Objetivos.....	4
4. Revisión de literatura.....	5
4.1. Métodos estadísticos para operar con proporciones.....	5
4.1.1. Comparación de un método de diagnóstico con respecto a un método estándar con muestras de infección conoci- da.....	5
4.1.2. Estimación de la confiabilidad estadística.....	7
4.1.3. Validación de un método de diagnóstico con respecto a un método estándar con muestras de infección desconocida.....	7
4.1.4. El índice de concordancia kappa.....	8
4.1.5. Número mínimo de brotes que debe incluir una muestra por árbol..	9
4.2. Patrones espaciales basados en dependencias.....	11
4.2.1. Dependencias espaciales basadas en métodos paramétricos.....	11
4.2.2. Dependencias espaciales basadas en métodos no paramétricos.....	12
4.2.2.1. Dependencias espaciales basadas en la distancia al árbol vecino más cercano.....	12
4.2.2.2. Tamaño y forma de foco.....	14
4.3. Muestreo para estimar incidencia e identificar árboles positivos.....	15
4.3.1. Muestreo jerárquico.....	15
4.3.2. Muestreo sistemático.....	16
5. Literatura citada.....	20
CAPITULO I. SENSIBILIDAD DE INMUNOIMRESION-ELISA Y DAS-ELISA EN EL DIAGNOSTICO Y MUESTREO DE <i>Citrus tristeza virus</i> EN HUERTOS COMERCIALES DE TAMAULIPAS, MÉXICO	
1.1. RESUMEN.....	26
1.2. ABSTRACT.....	27
1.3. INTRODUCCIÓN.....	28
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
1.4.1. Colecta de tejidos.....	29
1.4.2. Análisis serológicos.....	29
1.4.3. Comparación de inmunopresión-ELISA con positivos históricos.....	31
1.4.4. Comparación de inmunopresión-ELISA en muestras negativas e infec- ción desconocida.....	32
1.4.5. Estimación del número de pecíolos por muestra.....	32
1.5. RESULTADOS.....	33
1.5.1. Comparación de inmunopresión-ELISA en árboles positivos históricos..	33

1.5.2. Comparación de inmunopresión-ELISA en muestras negativos e infección desconocida.....	34
1.5.3. Estimación del número de pecíolos por muestra.....	34
1.6. DISCUSION.....	35
1.7. CONCLUSIONES.....	37
1.8. AGRADECIMIENTOS.....	37
1.9. LITERATURA CITADA.....	37

CAPITULO II. DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DE LA DISPERSIÓN DEL *Citrus tristeza virus* EN TAMAULIPAS: IMPLICACIONES EN MUESTREO Y ERRADICACIÓN

2.1. RESUMEN.....	44
2.2. INTRODUCCIÓN.....	45
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.3.1. Lugar de estudio.....	46
2.3.2. Censos extensivos y erradicación.....	46
2.3.3. Censos restrictivos.....	46
2.3.4. Colecta de tejidos y análisis serológicos.....	48
2.3.5. Dinámica espacial de la dispersión del <i>Citrus tristeza virus</i>	48
2.3.6. Valoración de la erradicación como estrategia de control.....	49
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
2.4.1. Dinámica espacial de la dispersión del <i>Citrus tristeza virus</i>	49
2.4.2. Progreso temporal del <i>Citrus tristeza virus</i>	52
2.4.3. Valoración de la erradicación como estrategia de control.....	53
2.5. CONCLUSIONES.....	54
2.6. AGRADECIMIENTOS.....	54
2.7. LITERATURA CITADA.....	55

CAPITULO III. EFICIENCIA DEL MUESTREO SISTEMATICO PARA ESTIMAR LA INCIDENCIA DEL *Citrus tristeza virus* EN PLANTACIONES COMERCIALES DE CITRICOS EN TAMAULIPAS

3.1. RESUMEN.....	59
3.2. INTRODUCCION.....	60
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
3.3.1. Huerta de estudio.....	61
3.3.2. Caracterización espacial de los mapas de incidencia.....	61
3.3.3. Sesgo y eficiencia del muestreo sistemático.....	61
3.4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	63
3.4.1. Caracterización espacial de los mapas de incidencia.....	63
3.4.2. Sesgo y eficiencia del muestreo sistemático.....	64

3.5. CONCLUSIONES.....	71
3.6. LITERATURA CITADA.....	71
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.....	74
APENDICE A	
A.1. Descripción de las huertas donde se colectaron los tejidos.....	78
A.2. Estimación de la sensibilidad, índices predictivos y concordancia.....	79
A.3. Estimación de la incidencia aplicando dos métodos de diagnóstico en muestras de infección desconocida.....	82
A.4. Estimación del índice de concordancia kappa.....	84
A.5. Descripción de la técnica de Inmunopresión-ELIA.....	85
A.6. Literatura citada.....	87
APÉNDICE B	
B.1. Mapas de dispersión de los huertos censados.....	88
B.2. Literatura citada.....	94
APÉNDICE C	
C.1. Intervalos de muestreo para cada tamaño de cuadrante.....	95
C.2. Estimaciones obtenidas por simulación.....	97
C.3. Distribución muestral aproximada del estimador de la incidencia.....	103

INDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.	Tabla de concordancia con los resultados del estudio de validación de una prueba de diagnóstico nuevo con respecto a una prueba estándar.....	6
Cuadro 2.	Indicadores de capacidad operativa y exactitud de una prueba de diagnóstico empleados para comparar el desempeño de un método de diagnóstico nuevo con respecto a una prueba de diagnóstico estándar.....	6
Cuadro 1.1.	Características de las huertas comerciales con árboles de infección conocida donde se colectaron los tejidos utilizados en el análisis serológico por inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA. Tamaulipas, 2004.....	40
Cuadro 1.2.	Características de las huertas comerciales con árboles de infección desconocida y reciente donde se colectaron los tejidos utilizados en el análisis serológico por inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA. Tamaulipas, 2004.....	40
Cuadro 1.3.	Concordancia estimada entre inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico de árboles positivos históricos. Tamaulipas, 2004.....	41
Cuadro 1.4.	Sensibilidad estimada de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en la detección de CTV en muestras de infección desconocida.....	41
Cuadro 1.5.	Probabilidad de detectar, con inmunopresión-ELISA, un árbol con al menos un brote positivo a CTV y número de brotes que proporcionaron información sobre la infección. Tamaulipas, 2004.....	41
Cuadro 2.1.	Características de cuatro huertos censados para evaluar el desempeño de la erradicación de plantas positivas al CTV en naranja. Tamaulipas, 2004.....	47
Cuadro 2.2.	Características de las huertas censadas restringidamente para validar el patrón de dispersión del CTV.....	47
Cuadro 2.3.	Distancias observadas de dispersión de CTV con respecto a los positivos previos más cercanos.....	50
Cuadro 2.4.	Distancias observadas al árbol vecino positivo más cercano en tres huertas de cítricos muestreados restrictivamente. Tamaulipas, 2004.....	52
Cuadro 3.1.	Sesgo de la incidencia estimada con todas las muestras sistemáticas simples y por simulación con cuadrantes orientados dentro de hileras.....	65
Cuadro 3.2.	Sesgo de la incidencia estimada con todas las muestras sistemáticas simples y por simulación con cuadrantes simétricos.....	66
Cuadro 3.3.	Sesgo de la incidencia estimada con todas las muestras sistemáticas simples y por simulación con cuadrantes orientados entre hileras.....	67
Cuadro 3.4.	Eficiencia de la estimación de la varianza y porcentaje de cobertura	

	con cuadrantes orientados dentro de hileras.....	68
Cuadro 3.5.	Eficiencia de la estimación de la varianza y porcentaje de cobertura en la estimación de la media con cuadrantes simétricos.....	69
Cuadro 3.6.	Eficiencia de la estimación de la varianza y porcentaje de cobertura en la estimación de la media con cuadrantes orientados entre hileras.....	70

INDICE DE CUADROS EN APENDICES

	Página	
Cuadro A.1.	Características de las huertas por antecedente de infección en donde se colectaron los tejidos empleados en la comparación de inmunopresión-ELISA con respecto a DAS-ELISA en la detección del CTV. Tamaulipas, 2004.....	78
Cuadro A.2.	Comparación de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en la detección de árboles positivos al CTV en tres antecedentes de infección. Tamaulipas, 2004.....	79
Cuadro A.3.	Valores estimados de los parámetros epidemiológicos para medir el desempeño de un método nuevo de diagnóstico con respecto a una prueba de diagnóstico estándar.....	80
Cuadro A.4.	Frecuencias observadas y probabilidades de detección en la validación de inmunopresión-ELISA con respecto a DAS-ELISA como método de referencia, en la detección del virus de la tristeza de los cítricos. Tamaulipas, 2004.....	82
Cuadro A.5.	Estimación del índice de concordancia kappa entre dos métodos de diagnóstico del CTV en dos antecedentes de infección. Tamaulipas, 2004.....	84
Cuadro B.1.	Características de las huertas muestreadas para validar el patrón espacial de dispersión del virus de la tristeza de los cítricos. Tamaulipas, México. 2004.....	88
Cuadro C.1.	Número de muestras para hileras y columnas, intervalos de muestreo para cada tamaño de muestra y número de muestras sistemáticas simples que se puede obtener para cada tamaño de muestra....	96
Cuadro C.2.	Incidencia (\hat{p}_D) y varianza (\hat{p}_D) estimada por simulación con 10000 remuestreos bootstrap, número promedio de plantas (n_e) muestreadas, cuadrado medio del error de la incidencia estimada con simulación con respecto al valor verdadero, e incidencia ($\bar{\hat{p}}_D$) y varianza ($V(\bar{\hat{p}}_D)$) estimada con enumeración de las muestras sistemáticas simples. Censo de 2002.....	97
Cuadro C.3.	Incidencia (\hat{p}_D) y varianza (\hat{p}_D) estimada por simulación con	

	10000 remuestreos bootstrap, número promedio de plantas (n_e) muestreadas, cuadrado medio del error de la incidencia estimada con simulación con respecto al valor verdadero, e incidencia ($\bar{\hat{p}}_D$) y varianza ($V(\bar{\hat{p}}_D)$) estimada con enumeración de las muestras sis- temáticas simples. Censo de 2003.....	99
Cuadro C.4.	Incidencia (\hat{p}_D) y varianza (\hat{p}_D) estimada por simulación con 10000 remuestreos bootstrap, número promedio de plantas (n_e) muestreadas, cuadrado medio del error de la incidencia estimada con simulación con respecto al valor verdadero, e incidencia ($\bar{\hat{p}}_D$) y varianza ($V(\bar{\hat{p}}_D)$) estimada con enumeración de las muestras sis- temáticas simples. Censo de 2004.....	101

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	A) Representación esquemática de las distancias al vecino positivo más cercano a partir de un árbol positivo previo. B) Longitud en metros de las distancias al vecino positivo más cercano cuando las hileras se encuentran espaciadas 8 m y los árboles 6 metros.....	13
Figura 2.	A) Representación esquemática de las distancias al vecino positivo más cercano a partir de un árbol positivo previo. B) Longitud en metros de las distancias al vecino positivo más cercano cuando las hileras y los árboles se encuentran espaciadas 8 metros.....	14
Figura 3.	Enumeración de las 16 muestras sistemáticas simples que se pueden obtener con un tamaño de muestra de 5 hileras con 5 árboles cada una. Cada una de las 16 muestras posibles está indicada con una letra.....	20
Figura 1.1.	Número mínimo de brotes en una muestra para detectar un árbol con al menos un brote positivo a CTV empleando impresiones dobles por pecíolo para la técnica de inmunoimpresión-ELISA.....	42
Figura 2.1.	Dispersión del CTV a partir del vecino positivo más cercano (A: huerta L1 y B, C: huerta M1). Dependencias espaciales continuas (D: huerta L1 y E,F: huerta M1)	51
Figura 2.2.	A) Índice de compactación, B) Índice de forma de la dispersión del CTV en la huerta M1. Tamaulipas, 2004.....	52

INDICE DE FIGURAS EN APENDICES

		Página
Figura A.1.	A) Diagrama del protocolo de inmunoimpresión-ELISA empleado para la detección del CTV. B) Esquema del protocolo de inmunoimpresión-ELISA para la detección del CTV con el método de biotina-streptavidina (BIO/SA)	87
Figura C.1.	Distribución muestral aproximada del estimador de la incidencia de plantas positivas basado en 10000 muestras bootstrap para el muestreo de árboles individuales.....	103
Figura C.2.	Distribución muestral aproximada del estimador de la incidencia de plantas positivas basado en 10000 muestras bootstrap para el cuadrante de tamaño 2x3.....	104
Figura C.3.	Distribución muestral aproximada del estimador de la incidencia de plantas positivas basado en 10000 muestras bootstrap para el cuadrante de tamaño 2x2.....	105

INDICE DE PROGRAMAS

	Página
Listado A.1. Función que permite estimar la sensibilidad, índice predictivo de positivos y concordancia de dos técnicas de diagnóstico con árboles de infección conocida.....	80
Listado A.2. Función para estimar la sensibilidad y su intervalo de confianza en la comparación de dos técnicas de diagnóstico con árboles de infección desconocida.....	83
Listado A.3. Función que permite estimar la concordancia entre dos métodos de diagnóstico aplicados simultáneamente a una muestra de infección desconocida.....	84

INTRODUCCIÓN GENERAL

La citricultura nacional representa una actividad económica con valor estimado de 5242.4 millones pesos, generando 700000 empleos directos y 250000 empleos indirectos (SAGARPA, 2002). Dada la importancia de esta actividad y ante la amenaza que representa el virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV), la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) ha establecido un Programa Nacional de Reconversión Productiva de la Cadena Citrícola. Este Programa tiene como objetivo transformar la citricultura mexicana tradicional en una citricultura moderna, altamente competitiva, con cadenas producción-consumo eficientemente articulada, libre de enfermedades virales y con una oferta de productos de calidad y diversificada que signifique una mejor oportunidad de empleo e ingresos para los productores (Diario Oficial de la Federación, 2003).

Como parte integral de este programa se encuentran las estrategias para el manejo de los problemas fitosanitarios que la aquejan, como son el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha* spp). En lo que respecta al virus de la tristeza de los cítricos se ha establecido una normatividad oficial NOM-031-FITO-2000 que rige las acciones para el combate del virus y su principal vector, el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*). Para que las acciones emprendidas sean efectivas, se requiere, además de la cooperación de las instancias involucradas, información epidemiológica actualmente no disponible para las condiciones de México.

Para la erradicación de plantas positivas, anticipándose al eventual establecimiento de pulgón café en el país, es necesario disponer un método de diagnóstico que sea económico, confiable y oportuno, además de un método de muestreo que indique cómo seleccionar los árboles en un proceso de muestreo. Adicionalmente, se deben conocer las tasas de dispersión del virus, tanto temporal como espacial, características que proporcionen las bases biológicas para la aplicación del principio de erradicación.

1. Planteamiento del problema

La tristeza de los cítricos es una enfermedad ocasionada por el *Citrus tristeza virus* (CTV) que afecta a todas las especies de cítricos que se encuentren injertados sobre el naranjo agrio (*Citrus aurantium*), así como al limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). En asociación con el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*), considerado como su vector más eficiente, ha ocasionado la muerte de más de 116000000 de árboles en los países citrícolas como España, Brasil, Estados Unidos, Venezuela y Argentina, entre otros (Cambra *et al.*, 2000a).

Tomando en cuenta que el 95% de la citricultura mexicana se encuentra establecida en patrones susceptibles, principalmente naranjo agrio, así como la gran susceptibilidad del limón mexicano a esta enfermedad, y considerando que en el país ya se encuentra establecido el pulgón café, la SAGARPA implementó en el 2000 la Campaña contra el Virus Tristeza de los Cítricos (NOM-031-FITO-2000), con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de plantas positivas al virus para reducir cantidad de inóculo ante el eventual establecimiento del pulgón café en el país.

Como parte de esta campaña contra el virus de la tristeza se encuentra: (i) monitoreo permanente del virus y sus vectores asociados (*A. gossypii*, *A. speraecola*, *T. auranti*, *T. citricida*), y (ii) la erradicación de los brotes de árboles positivos detectados. Para implementar una estrategia adecuada de monitoreo y erradicación, es necesario tomar en cuenta las características biológicas y epidemiológicas en el establecimiento de este programa. En particular: a) el método de detección de plantas positivas, b) las consideraciones espacio-temporales de la dispersión en el proceso de erradicación, y c) como seleccionar las muestras vegetales en una huerta citrícola.

Método de diagnóstico. La norma oficial mexicana (NOM-031-FITO-2000) establece que las plantas deben diagnosticarse con el método serológico DAS-ELISA. Con el

empleo combinado de los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 es posible discriminar la mayoría de las plantas infectadas de las que no lo están (Cambra *et al.*, 1993). Sin embargo, para esta se documentan varios inconvenientes (Cambra *et al.*, 2000b; Ben-Ze'ev *et al.*, 1989): requiere una gran cantidad de tiempo para el procesamiento del tejido vegetal; pérdida de titulación viral por temperaturas altas y tiempo transcurrido desde la infección; cuando algunas muestras tienen valores muy cercanos a la absorbancia base, es necesario tomar muestras un mes después para corroborar el diagnóstico, por lo cual, esta técnica de diagnóstico puede no ser oportuna.

Efecto espacial y temporal de la dispersión en la erradicación. El procedimiento actual aplicado cuando se detecta un planta positiva en una huerta es diagnosticar toda la huerta y erradicar todas las plantas positivas (NOM-031-FITO-2000). Una vez concluido el proceso, no se tiene un seguimiento posterior de la huerta. Este procedimiento es costoso, requiere de una cantidad significativa de tiempo, y puede no ser el adecuado, y en ocasiones ha mostrado no ser efectiva para la erradicación del virus en una huerta (Ben-Ze'ev *et al.*, 1989; Góngora, 2004; Loeza, 2003). En fitopatógenos transmitidos por vectores y debido al fenómeno de contagio, el procedimiento de eliminar árboles vecinos a un positivo erradicado ha sido efectivo en la erradicación del bunchy top disease en plátano (Allen, 1977) y cocoa swollen shoot disease en cacao (Thresh y Owusu, 1986). Sin embargo, con respecto al CTV en México no se tiene información epidemiológica sobre la dinámica espacial de dispersión y los factores inmediatos que influyen sobre ésta, para implementar este procedimiento. Así mismo, tampoco se ha valorado la efectividad de la erradicación de plantas positivas en la eliminación del virus de la tristeza en una huerta, cuando pueden existir árboles positivos contiguos recién infectados.

Selección de una muestra. La norma oficial mexicana establece que debe muestrearse el 10 % de las plantas de una huerta. Sin embargo, no establece el procedimiento que debe seguirse para seleccionar las plantas en las cuales se toma la muestra vegetal. En la práctica, cada Comité Estatal de Sanidad Vegetal ha establecido su propio esquema

de muestreo, que en la mayoría de los casos consiste en seleccionar los árboles con un esquema sistemático. Puesto que todo sistema de muestreo está afectado por dos procesos: el patrón de la disposición de los árboles positivos, el cual es dinámico, y el esquema de selección de las unidades muestrales (Ferrandino, 2004), es necesario evaluar el desempeño del esquema para la selección de las unidades muestrales, y cuantificar la incertidumbre en las inferencias obtenidas. En este contexto, el principal problema es estudiar un esquema de muestreo en condiciones epidémicas de baja intensidad. Esta restricción adquiere mayor relevancia en huertas con gran cantidad de árboles y con enfermedades cuya expresión de síntomas están enmascarados o no son visibles. Este es el caso de la tristeza de los cítricos con las variantes actualmente existentes en México.

2. Hipótesis

La efectividad del muestreo de la tristeza de los cítricos en huertas comerciales está en función del conocimiento de los procesos involucrados en la patogénesis a nivel de planta y del contagio de las mismas, los cuales determinan la eficiencia del método de diagnóstico por aplicar y el procedimiento de selección del tejido vegetal, así como la estructura y dinámica espacial de plantas enfermas en una huerta. La dinámica espacial de las plantas enfermas influye a su vez en el procedimiento de erradicación de las mismas y en tres aspectos fundamentales de un sistema de muestreo: frecuencia de muestreo, tamaño de muestra y selección de las unidades muestrales.

3. Objetivos

Los objetivos específicos que se plantearon en el presente trabajo fueron los siguientes:

1. Evaluar la efectividad de la técnica serológica inmunopresión-ELISA para la detección oportuna y confiable del *Citrus tristeza virus* considerando criterios cualitativos y biológicos.

2. Evaluar la dispersión de la tristeza en el contexto del programa oficial de erradicación de plantas positivas al virus de la tristeza.
3. Determinar el efecto (sesgo y eficiencia relativa) de la disposición espacial de plantas positivas en el tamaño de muestra y los esquemas de selección de las unidades muestrales en huertos comerciales de cítricos.

4. Revisión de literatura

4.1. Métodos estadísticos para operar con proporciones

4.1.1. Comparación de un método de diagnóstico con respecto a un método estándar con muestras de infección conocida

La comparación de un método de diagnóstico nuevo con respecto a otro de diagnóstico estándar consiste en aplicar ambos métodos a un grupo de individuos de infección conocida y medir la concordancia entre ambos (Greenhalgh, 1997). Esta comparación se debe realizar en un espectro adecuado de sujetos (Fritz y Waimer, 2001). En este caso, la población de árboles positivos históricos es la población que cumple con la condición para la validación comparativa. Los resultados del diagnóstico se resumen en una tabla de concordancias (Cuadro 1). La comparación de ambos métodos de diagnóstico se realiza mediante los índices siguientes: índices de capacidad operativa (sensibilidad), índices de capacidad de diagnóstico (índice predictivo de positivos) y exactitud. La descripción, interpretación y forma de cálculo de estos parámetros se muestran en el Cuadro 2. En todo este escenario, es conveniente indicar que una prueba de diagnóstico rara vez es 100 % exacta y puede incurrir en dos tipos de errores: falsos positivos y falsos negativos.

La probabilidad de que un árbol con infección viral resulte positivo al aplicarle una prueba de diagnóstico se conoce como sensibilidad. Este índice se emplea para descar-

tar la presencia de la infección viral. Sin embargo, si la prueba resulta positiva, no podría asegurarse que la planta esté infectada, ya que al ser sensible la prueba podría volverse anormal con árboles sanos (falsos positivos). Asociado a la sensibilidad se encuentra el índice predictivo de positivos (IPP), que proporciona la probabilidad de que una planta tenga la infección viral si el resultado del diagnóstico fue positivo, por lo cual, la sensibilidad mide la capacidad de la prueba para identificar a los árboles que tienen la infección viral (Knottnerus *et al.*, 2002; Sackett y Haynes, 2002). Así, un método de diagnóstico es válido si detecta correctamente la mayoría de las plantas que tienen al virus (sensible), excluye la mayoría de las plantas que no tienen al virus (específica) y una alta proporción de diagnósticos coincidentes (exacta) (Greenhalgh, 1997).

Cuadro 1. Tabla de concordancia con los resultados del estudio de validación de una prueba de diagnóstico nuevo con respecto a una prueba estándar.

Resultado del método nuevo	Resultado del método estándar		Total
	Plantas positivas	Plantas negativas	
Plantas positivas	Positivos verdaderos (x_{11})	Falsos positivos (x_{12})	$x_{1\bullet}$
Plantas negativas	Falsos negativos (x_{21})	Negativos verdaderos (x_{22})	$x_{2\bullet}$
Total	$x_{\bullet 1}$	$x_{\bullet 2}$	$x_{\bullet\bullet}$

Cuadro 2. Indicadores de capacidad operativa y exactitud de una prueba de diagnóstico empleados para comparar el desempeño de un método de diagnóstico nuevo con respecto a una prueba de diagnóstico estándar.

Característica	Nombre alternativo	Pregunta respondida	Formula
Sensibilidad	Proporción de positivos verdaderos (dado que tienen el virus)	¿Qué tan efectiva es la prueba en detectar un árbol que tiene la infección viral?	$\frac{x_{11}}{x_{1\bullet}}$
Índice predictivo de positivos	Probabilidad de un diagnóstico positivo	¿Si un árbol se diagnóstica positivo, cual es la probabilidad de que tenga la infección viral?	$\frac{x_{11}}{x_{1\bullet}}$
Exactitud	----	¿Qué proporción de todas los diagnósticos proporcionan un resultado correcto?	$\frac{x_{11} + x_{22}}{x_{\bullet\bullet}}$

4.1.2. Estimación de la confiabilidad estadística

Debido a que los índices listados en el Cuadro 2 se basan en proporciones, un intervalo de confianza para esos índices epidemiológicos se puede construir mediante: $\hat{p} \pm z_{\alpha/2} n^{-1/2} [\hat{p}(1 - \hat{p})]^{-1/2}$, donde \hat{p} es el valor estimado del índice y $z_{\alpha/2}$ es el percentil $100(1 - \alpha/2)$ de la distribución normal estándar (Bishop *et al.*, 1975). Así mismo, es conocido que, cuando n es “pequeño” y la \hat{p} es “cercano” a 0 o 1, el intervalo de confianza anterior proporciona valores menores de 0 o mayores de 1, respectivamente. Existen varias alternativas para estimar un intervalo de confianza bajo estas condiciones. En términos de error absoluto y amplitud del intervalo, el método Bayesiano propuesto por Jeffreys es el más recomendado (Brown *et al.*, 2001). Supóngase que $x \sim \text{Bin}(n, p)$ y que p tiene distribución *a priori* $\text{Beta}(a_1, a_2)$, entonces la distribución *a posteriori* de p es $\text{Beta}(x + a_1, n - x + a_2)$. Un intervalo de confianza del $100(1 - \alpha/2)\%$ esta dado por

$$[\text{B}(\alpha/2; x + a_1, n - x + a_2), \text{B}(1 - \alpha/2; x + a_1, n - x + a_2)] \quad (1)$$

donde $\text{B}(\alpha; m_1, m_2)$ denota el cuantil α -ésimo de la distribución $\text{Beta}(\alpha; m_1, m_2)$. En este trabajo se empleo la versión Clopper-Pearson del intervalo en (1), que esta dado por:

$$[\text{B}(\alpha/2; x, n - x + 1), \text{B}(1 - \alpha/2; x + 1, n - x)]$$

modificando el intervalo a $[0, 1]$ cuando $x = 0$ (Brown *et al.*, 2001).

4.1.3. Validación de un método de diagnóstico con respecto a un método estándar con muestras de infección desconocida

El escenario más útil en la comparación de dos métodos de diagnóstico es cuando se desconoce la condición de infección en una población. Un procedimiento, adaptado de la epidemiología médica para medir el desempeño de un programa de detección de plantas positivas, consiste en diagnosticar simultáneamente una población de infección desconocida con ambos métodos de diagnóstico aplicados independientemente a cada

individuo de la población. En el cálculo de la sensibilidad para cada método, el método de diagnóstico alternativo es considerado como el método estándar o de referencia (Goldberg y Wittes, 1978).

Sea d_j ($j = 1, 2$) el número de muestras positivas detectadas con el método de detección j y b las muestras positivas detectadas con ambos métodos de diagnóstico. La sensibilidad (proporción de plantas detectadas positivas dado que tienen la infección viral) para cada método de diagnóstico es $\hat{p}_1 = b/d_2$ y $\hat{p}_2 = b/d_1$ si $d_1, d_2 \neq 0$. La varianza de cada estimador es $\text{Var}(\hat{p}_1) = n^{-1}[\hat{p}_1(1 - \hat{p}_1)/\hat{p}_2]$ y $\text{Var}(\hat{p}_2) = n^{-1}[\hat{p}_2(1 - \hat{p}_2)/\hat{p}_1]$. La sensibilidad estimada aplicando ambos métodos de diagnóstico es $\hat{p} = \hat{p}_1 + \hat{p}_2 - \hat{p}_1\hat{p}_2$ con varianza $\text{Var}(\hat{p}) = [\hat{p}(1 - \hat{p})(\hat{p}_1 + \hat{p}_2)](n\hat{p}_1\hat{p}_2)^{-1}$. La razón de falsos negativos es $\hat{\theta} = 1 - \hat{p}$ (Goldberg y Wittes, 1978). La concordancia entre ambos métodos de diagnóstico se puede medir con el índice de concordancia kappa (Sim y Wright, 2005).

4.1.4. El índice de concordancia kappa

Otro indicador tomado de la epidemiología médica es el índice Kappa, que mide la concordancia entre dos métodos de diagnóstico aplicados a una población de infección desconocida (Azzimonti, 2005), que se define como:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

donde P_o es la proporción de observaciones concordantes:

$$P_o = \sum_i p_{ii} = p_{11} + p_{22}$$

y P_e es la concordancia esperada por el azar:

$$P_e = \sum_i p_{i\cdot}p_{\cdot i} = p_{1\cdot}p_{\cdot 1} + p_{2\cdot}p_{\cdot 2}$$

con $p_{ij} = x_{ij} / x_{..}$ de acuerdo con la notación del Cuadro 1. La varianza del índice de concordancia kappa es:

$$\text{Var}(\kappa) = \frac{\sum_i p_{i\cdot} p_{\cdot i} + \left(\sum_i p_{i\cdot} p_{\cdot i}\right)^2 - \sum_i p_{i\cdot} p_{\cdot i} (p_{i\cdot} + p_{\cdot i})}{n \left(1 - \sum_i p_{i\cdot} p_{\cdot i}\right)^2}$$

El rango de valores posibles del índice κ es de -1 a 1, aunque generalmente toma valores de 0 a 1. La máxima concordancia posible corresponde a $\kappa = 1$. El valor $\kappa = 0$ se obtiene cuando la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar. Si la concordancia es mayor que la esperada a causa del azar, $\kappa > 0$, mientras que si es menor, $\kappa < 0$ (Sim y Wright, 2005).

Para interpretar el índice kappa se debe determinar si es diferente o no de cero. Este criterio se verifica realizando la prueba de hipótesis con el estadístico:

$$\frac{|\kappa|}{\sqrt{\text{Var}(\kappa)}} \quad (2)$$

y comparando su valor con el cuantil z_α de la distribución normal estándar mediante la regla de decisión: Rechazar la hipótesis nula ($H_0 : \kappa = 0$) si el valor del estadístico en (2) es mayor o igual al cuantil $z_{1-\alpha/2}$ de la distribución normal estándar.

4.1.5. Número mínimo de brotes que debe incluir una muestra por árbol

La consideración del número de submuestras para constituir una muestra compuesta que estime adecuadamente el carácter positivo de al menos uno de los elementos de la submuestra fue propuesto por Huges *et al.* (1997) para el caso de DAS-ELISA aplicado al CTV. Debido a que la técnica de inmunopresión-ELISA se ha propuesto para muestras compuestas de varios pecíolos por árbol, se puede extender el método de estos investigadores para estimar el número mínimo de pecíolos en la muestra que garantice la confiabilidad de la detección. El principio de este método es determinar la condición de heterogeneidad en la distribución de árboles o brotes positivos.

Para explorar el efecto de la heterogeneidad en la disposición de los brotes positivos alrededor del dosel del árbol se partió del esquema convencional de muestreo por inmunopresión-ELISA propuesto por Cambra *et al.* (2000b). Se tomaron $n = 6$ brotes en cada uno de N árboles positivos. La proporción media de brotes positivos por árbol (p_{brote}) se estimó con

$$\hat{P}_{brote} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \hat{p}_{brote,i}$$

donde $\hat{p}_{brote,i}$ es la proporción de brotes positivos en el i -ésimo árbol. Si la disposición de los brotes positivos alrededor de los árboles es aleatoria, la distribución binomial proporciona una descripción adecuada de las frecuencias de los brotes positivos por árbol. La probabilidad de que un árbol tenga al menos un brote positivo se estimó con

$$\tilde{p}_{arbol} = 1 - (1 - \hat{p}_{brote})^n$$

Cuando la disposición de los brotes positivos alrededor de los árboles es agregada, la proporción de brotes positivos por árbol tiene función de probabilidades beta binomial. Bajo esta suposición, la probabilidad de que un árbol tenga al menos un brote positivo se estimó con

$$\tilde{p}_{arbol} = 1 - \prod_{i=0}^{n-1} \frac{1 - \hat{p}_{brote} + i\hat{\theta}}{1 + i\hat{\theta}}$$

donde θ es el índice de agregación de la distribución beta-binomial. En una muestra de n brotes por árbol, el número de brotes que proporciona información no redundante sobre la infección viral se conoce como tamaño efectivo muestra, que se estimó con (Madden y Hughes, 1999)

$$n_{deff} = \frac{\sum_{i=0}^{n-1} \ln \frac{1 - \hat{p}_{brote} + i\hat{\theta}}{1 + i\hat{\theta}}}{\ln(1 - \hat{p}_{brote})}$$

La estimación del índice de agregación θ se realizó con el algoritmo AS R93 (Smith y Ridout, 1995).

4.2. Patrones espaciales basados en dependencias

Una de las consideraciones fundamentales para un muestreo restringido al área de influencia de un foco de dispersión de la enfermedad, lo justifica la dispersión local de la enfermedad medida por varios métodos de caracterización de patrones espaciales de la enfermedad en varias regiones cítricas del mundo (Gottwald *et al.*, 1997, 1998, 1999; Cambra *et al.*, 2000a). El área de dispersión efectiva de una enfermedad permite teóricamente restringir el área de muestreo en torno a los árboles positivos, con una considerable reducción del tamaño de muestra, costo y oportunidad del muestreo.

Bajo esta suposición, es fundamental caracterizar la distancia de dispersión de los nuevos positivos en torno a los positivos de referencia. Entre estos métodos se cuentan con paramétricos: autocorrelación espacial, geoestadísticos y funciones de distribución de probabilidades, así como métodos no paramétricos: distancia al árbol vecino más cercano y dinámica de la dispersión de focos. Estos métodos permiten estimar las distancias a las cuales un método restrictivo podría ser efectivo. La disposición espacial de las plantas positivas influyen en el muestreo de la forma siguiente: a) determinan el tamaño y forma de las unidades de muestreo (de una a varias plantas) en función de la distancia de dispersión, y b) el tamaño de la muestra en función de la agregación de la población.

4.2.1. Dependencias espaciales basadas en métodos paramétricos

Estos métodos comprenden la estimación de algún parámetro que mide la asociación espacial entre las unidades de la población. Los métodos que se agrupan bajo esta característica comprenden los métodos basados en correlación y la estimación de algún parámetro de funciones de distribución de probabilidades que se asocian con la disposición espacial de los individuos.

Los métodos basados en correlación comprenden la autocorrelación espacial y los métodos geoestadísticos. Ambas técnicas ya han sido aplicados previamente en la caracterización del patrón espacial del CTV en México (Loeza, 2003; Góngora 2004) y en otras condiciones epidemiológicas (Gottwald *et al.*, 1997, 1998, 1999; Cambra *et al.*, 2000a). Así mismo, se encuentran disponibles suficiente información que describen las técnicas anteriormente citadas por lo que no se describen aquí. Para los métodos geoestadísticos puede consultarse Cressie (1993). De igual forma, la técnica de autocorrelación espacial y el software se encuentra descrita en Gottwald *et al.* (1992). Los métodos basados en distribución de probabilidades se encuentran descritas en Campbell y Madden (1990).

4.2.2. Dependencias espaciales basadas en métodos no paramétricos

4.2.2.1. Dependencias espaciales basadas en la distancia al árbol vecino más cercano

La presente derivación teórica se desarrolló teniendo en consideración un patosistema viral tipo tristeza de los cítricos (Marcus *et al.*, 1984). Los principios pueden adaptarse a otros sistemas fitosanitarios. Puesto que se desconoce la fuente de inóculo con la cual se infectan los árboles positivos nuevos con respecto a un patrón espacial previo, ésta se puede estimar con la distancia al árbol positivo previo más cercano, bajo el supuesto de que los vectores colonizan con mayor frecuencia los árboles vecinos respecto a los más distantes (Hermoso de Mendoza, 1998). Este enfoque requiere de estudios censales efectuados en distintos tiempos. La distancia euclidiana entre los árboles positivos nuevos detectados en el censo actual con respecto al árbol positivo más cercano detectado en censos anteriores proporciona la distancia al árbol vecino positivo más cercano.

El procedimiento para determinar la distancia al árbol positivo más cercano es el siguiente (Marcus *et al.*, 1984). Se tuvieron n árboles positivos previos en una huerta con hileras espaciadas b metros entre ellas y árboles espaciadas w metros dentro de

cada hilera. Sea d_i ($i = 1, \dots, n$) la distancia euclidiana entre el árbol positivo nuevo- i del censo actual y el árbol positivo de referencia más cercano del censo anterior. Si la distancia entre los árboles es menor que la distancia entre hileras ($w < b$), los valores posibles de las distancias d_i son $e_1 = w$, $e_2 = b$, $e_3 = (w^2 + b^2)^{1/2}, \dots$ (Figura 1.A). En la Figura 1.B se muestra la longitud de 6 a 19 m, que es el caso de la mayoría de las huertas de cítricos estudiadas previamente para las condiciones de Tamaulipas (Góngora, 2004), en las cuales las hileras se encuentran espaciadas 8 metros, y la distancia entre los árboles es de 6 metros. Para valorar la significancia de las distancias de dispersión observadas se obtuvo la frecuencia porcentual de cada distancia esperada $e_1 < e_2 < e_3 < \dots$. Cuando las distancias entre las hileras y los árboles es la misma, las distancias euclidianas entre los árboles nuevos y los árboles positivos de referencia se ilustran en la Figura 2.A. Las longitudes en metros de estas distancias se muestran en el Cuadro 2.B.

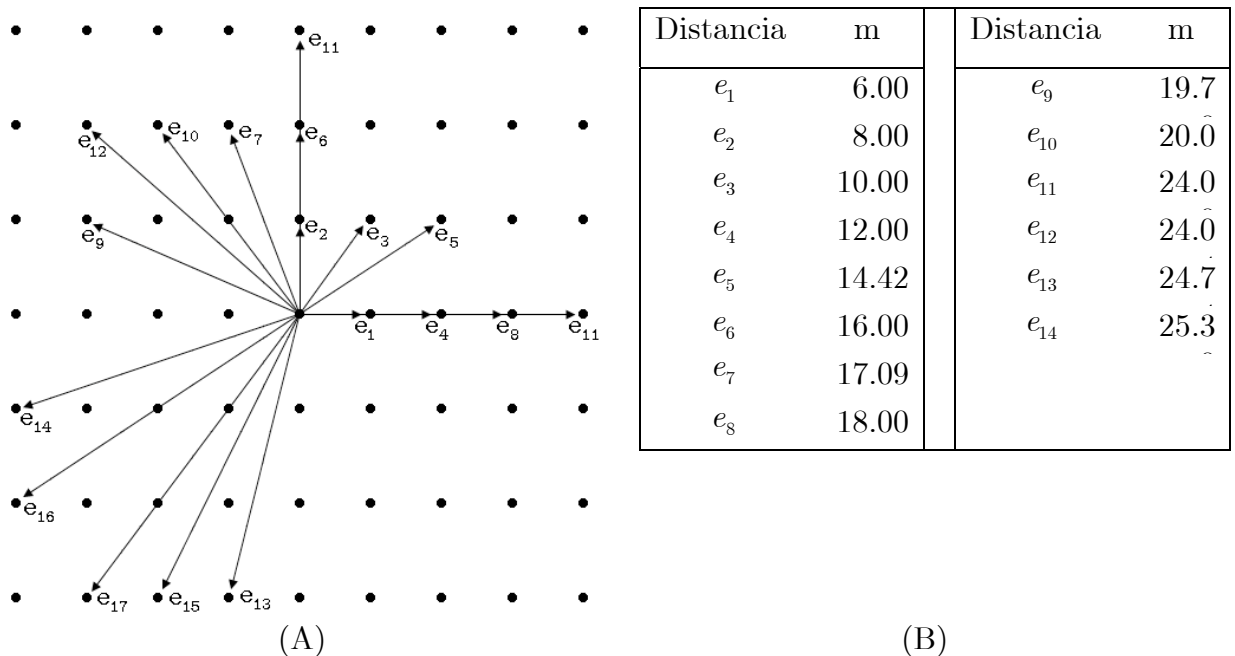


Figura 1. A) Representación esquemática de las distancias al vecino positivo más cercano a partir de un árbol positivo previo. B) Longitud en metros de las distancias al árbol vecino positivo más cercano cuando las hileras se encuentran espaciadas 8 m y los árboles 6 metros.

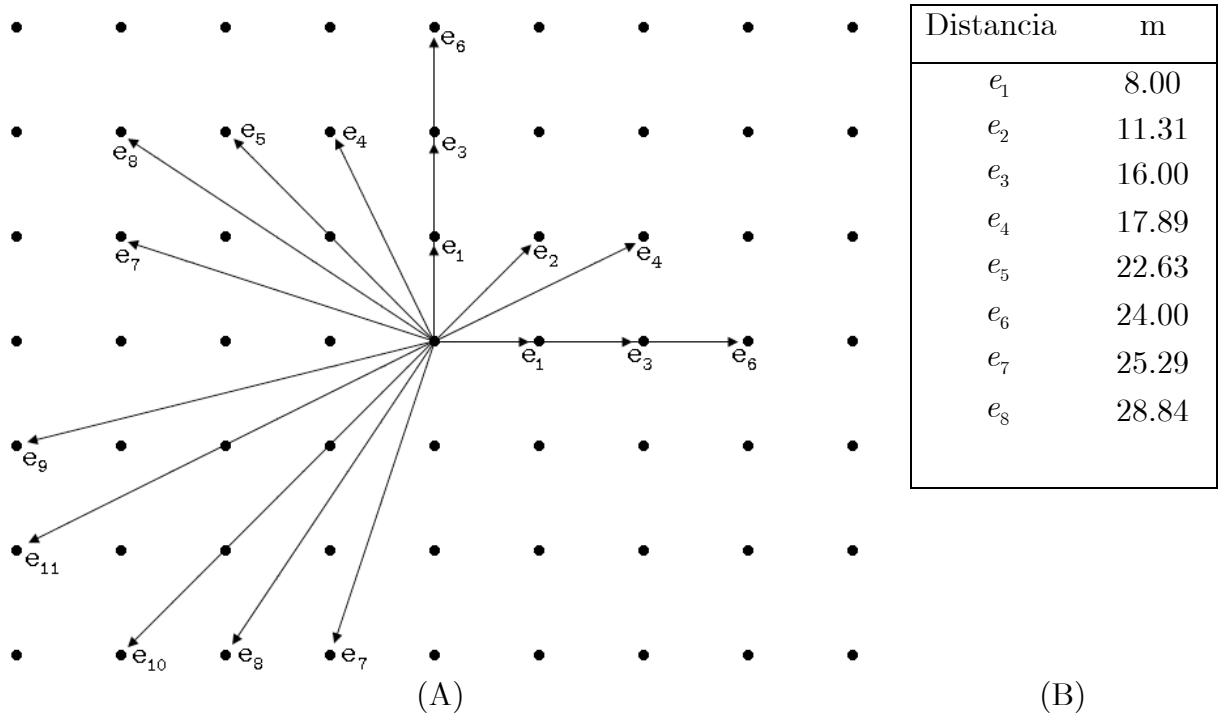


Figura 2. A) Representación esquemática de las distancias al vecino positivo más cercano a partir de un árbol positivo previo. B) Longitud en metros de las distancias al árbol vecino positivo más cercano cuando las hileras y los árboles se encuentran espaciadas 8 metros.

4.2.2.2. Tamaño y forma de focos

El análisis de la dinámica y estructura de los focos proporciona información sobre el número de focos totales y unitarios, tamaño medio, forma y compactación de los mismos. Con base a esta información se pueden generar estrategias de manejo del virus de la tristeza de los cítricos en huertas comerciales. Esta técnica se ha empleado para caracterizar la dinámica de dispersión de otros fitopatógenos transmitidos por vectores, como es el caso de la clorosis variegada de los cítricos (*Xyllella fastidiosa*) transmitido por 11 especies de cicadelidos (Laranjeira *et al.*, 2004).

En cada huerta censada se determinó el número de focos (NF), número de plantas en foco i -ésimo (NPF_i), número de hileras (lf_i) y columnas (lc_i) ocupadas por el foco i . Con la datos anteriores se estimó el índice de proximidad [$IP = NPF_i \cdot (lf_i \times lc_i)^{-1}$], el

índice de forma de los focos $IFF = l f_i \bullet l c_i^{-1}$ y el índice medio de forma de los focos con $IMFF = [\sum (l f_i \bullet l c_i^{-1})] \bullet NF^{-1}$. El índice de proximidad varía inversamente con la compactación de los focos (Nelson, 1996).

4.3. Muestreo para estimar incidencia e identificar árboles positivos

A pesar de la importancia del muestreo en el manejo de las enfermedades, únicamente se ha propuesto un sistema de muestreo para estimar la incidencia de árboles positivos al CTV en una huerta y una a escala regional. Este muestreo se denomina muestreo jerárquico y se describe a continuación (Hughes y Gottwald, 1998, 1999).

4.3.1. Muestreo jerárquico

Este tipo de muestreo se propuso con el fin de estimar la incidencia de la tristeza mediante el empleo de muestreo compuesto en un diagnóstico serológico por DAS-ELISA (Hughes y Gottwald, 1998), incorporando un componente espacial al procedimiento originalmente propuesto para el diagnóstico de la incidencia de virus en flores de corte de clavel (Rodoni *et al.*, 1994). El muestreo jerárquico se caracteriza porque tienen un componente de espacialidad proporcionada por la selección sistemática de las unidades muestrales (árboles agrupados en cuadrantes), estas muestras conservan esta espacialidad porque se registra la ubicación en campo de cada una de ellas, para su posterior uso en el diagnóstico de árboles individuales en caso de que la muestra compuesta asociada sea positiva (Hughes y Gottwald, 1998). Posteriormente, se agregó un componente regional al esquema básico anterior para tomar en cuenta la variabilidad extra proporcionada por *Toxoptera citricida* (Hughes y Gottwald, 1999). El estimador de la incidencia media de árboles positivos es el siguiente: se tienen N cuadrantes compuestos de n árboles cada uno. Si denotamos con \hat{p}_{high} a la proporción media de cuadrantes positivos (con al menos un árbol positivo), la proporción media de árboles

positivos se estima con $\tilde{p}_{low} = 1 - (1 - \hat{p}_{high})^{1/n}$, donde el tilde indica que la estimación se realizó con observaciones de otra escala (cuadrantes).

El esquema anterior se ha validado con datos de campo y simulados. Los datos de campo consistieron de 10 lotes cuya incidencia no se reportan. Los datos de simulación consistieron en generar aleatoriamente 100 poblaciones acomodadas en 20 hileras por 20 árboles con incidencias de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 y 10%. En estas poblaciones se aplicaron los siguientes esquemas de muestreo: a) muestreo de árboles individuales tomando muestras cada cinco hileras y cada cinco árboles b) muestreo de árboles individuales tomando muestras cada tres árboles y cada cuatro hileras muestreando el 6.25 % de la población, c) muestreo de árboles individuales tomando las muestras cada dos hileras y cada dos árboles muestreando el 25 % de la población, d) muestreo de cuadrantes de dos árboles por dos hileras con un intervalo de 10 árboles.

Los resultados mostraron que ninguno de los esquemas anteriores estimó insesadamente la incidencia. En mayoría de los casos se subestimó la incidencia, siendo menos fuerte en el diseño de (c) y (d). Estos resultados sugieren que estimar la proporción de árboles positivos cuando la incidencia es menor de 10 % es complicado. Este esquema podría proporcionar estimaciones insesgadas con incidencias mayores a 40% de árboles positivos en una huerta. Por otro lado la propuesta simulativa considera ocurrencia aleatoria de plantas enfermas cuando las evidencias experimentales indican condiciones agregadas para el CTV (Góngora, 2004; Loeza, 2003), excepto para niveles de muy baja prevalencia, menores de 1 % (Góngora, 2004).

4.3.2. Muestreo sistemático

Este muestreo se ha adaptado ampliamente en México para el muestreo de huertas para la detección de árboles positivos al CTV. Sin embargo, cada Comité Estatal de

Sanidad Vegetal que opera las campañas ha establecido el protocolo para la toma de las muestras, cumpliendo con un tamaño de muestra del 10 % de la huerta establecida en la normatividad oficial. Carecen de un soporte cuantitativo y mas bien se han empleado por el carácter operativo y práctico. Sin embargo, el planteamiento teórico para este tipo de muestreo existe y puede plantearse de la siguiente forma: una huerta es considerada como una población de unidades muestrales arregladas en M hileras y N columnas. Las $M \times N$ unidades muestrales son agrupadas en $m \times n$ bloques con $l \times k$ unidades cada una, donde $m = M \bullet l^{-1}$ y $n = N \bullet k^{-1}$. Si $l = M \bullet n^{-1}$ es el intervalo de muestreo para las hileras y $k = N \bullet m^{-1}$ para los árboles, una muestra sistemática simple se obtiene seleccionando aleatoriamente una hilera (u) de las l posibles y un árbol (v) de las k posibles, y seleccionando los $(mn - 1)$ árboles restantes de acuerdo al siguiente esquema:

$$S = \begin{cases} u + (i - 1)l, i = 1, \dots, n \\ v + (j - 1)k, j = 1, \dots, m \end{cases}$$

así, la muestra estará compuesta por los árboles en las coordenadas dada por hileras y árboles (Bellhouse y Rao, 1975).

Sea X la variable aleatoria que denota el resultado del diagnóstico el j -ésimo árbol de la i -ésima hilera

$$X_{ij} = \begin{cases} 0, & \text{si la planta resulta negativa} \\ 1, & \text{si la planta resulta positiva} \end{cases}$$

Entonces un estimador insesgado de la incidencia de plantas positivas esta dado por (Ridout y Xu, 2000):

$$\hat{p} = \frac{1}{mn} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m X_{ij}$$

Con una muestra simple no es posible obtener una estimación insesgada de la varianza del estimador de la incidencia de plantas positivas (D'Orazio, 2003).

Cuando se cuenta con una población conocida se emplean dos procedimientos para obtener una estimación del estimador de la incidencia, para lo cual se emplean dos métodos: simulación bootstrap (Naranjo y Hutchison. 1997) y enumeración de todas las muestras sistemáticas (Wolter, 1985). La metodología de remuestreo o simulación se ha empleado anteriormente para comparar el desempeño de varios esquemas de muestreo en poblaciones de artrópodos (Naranjo y Hutchison, 1997; Smith *et al.*, 1995). En fitopatología se ha empleado para comparar esquemas de muestreo secuenciales en la estimación del porcentaje de frutos de infectados por *Monilinia vaccinii-corymbosi* (Copes *et al.*, 2001).

Simulación bootstrap. Esta metodología se aplica también cuando no se cuenta con una población de incidencia conocida, para estimar el error asociado con la estimación de la incidencia empleando una muestra sistemática simple. El procedimiento general se conoce como simulación bootstrap y se describe a continuación (Sitter, 1992):

1. Se seleccionan r muestras sistemáticas simples con inicio aleatorio $\{s_{D,k,ij}^*\}_{i=1, j=1, j=1}^{n_1, n_2, r}$. En cada muestra se estima la incidencia de plantas positivas $\{\hat{p}_l^*\}_{l=1}^r$ a CTV.
2. Se estima la varianza de \hat{p} con $s_p^2 = (r-1)^{-1} \sum_{l=1}^r (\hat{p}_l^* - E_*[\hat{p}^*])^2$, donde $E_*[\hat{p}^*] = r^{-1} \sum_{l=1}^r \hat{p}_l^*$ es el valor esperado de la incidencia estimada con los r remuestreos generados.

Así, s_p^2 es una aproximación Montecarlo de la varianza del estimador de la incidencia de plantas positivas en una huerta. Este procedimiento general se ha empleado para comparar la eficiencia del muestreo sistemáticos adaptativos con respecto al muestreo aleatorio simple (Smith *et al.*, 1995).

Enumeración de las muestras sistemáticas. Cuando se cuenta con una población conocida, es posible conocer las $l \times k$ muestras posibles de $m \times n$ unidades muestrales. Pa-

ra ilustrar el procedimiento, suponga que se tiene una población de 20 hileras por 20 árboles y se obtiene una muestra sistemática de árboles individuales de 5 hileras por 5 árboles. Se tiene un intervalo de muestreo de $l = 4$ hileras y $k = 4$ árboles, obteniendo $l \times k = 16$ muestras simples que se indican en la Figura 3. La primera muestra sistemática consiste de todos los árboles marcados con la letra a, la segunda con la letra b, y la última muestra sistemática simple esta indicada con la letra t. Con las $l \times k$ muestras sistemáticas simples así obtenidas es posible obtener una estimación insesgada de varianza del estimador de la incidencia de plantas positivas. La contraparte de la aproximación Montecarlo de s_p^2 esta dada por $V(\hat{p}) = \sum_{j=1}^k (\bar{\hat{p}} - \hat{p}_j)^2$, donde \hat{p}_j y $\bar{\hat{p}} = k^{-1} \sum_{j=1}^k \hat{p}_j$, es la incidencia estimada con la muestra sistemática simple j -ésima y la media de todas las muestras sistemáticas simples.

Estimación del sesgo. Para medir el exactitud del muestreo sistemático en la estimación de la incidencia, se obtuvo el sesgo de las estimaciones obtenidas con respecto a la incidencia verdadera obtenida mediante censo (D’Orazio, 2003). El sesgo con respecto a la incidencia obtenida por enumeración de las muestras sistemáticas mediante $B_{sys} = \hat{p} - \bar{\hat{p}}$ y con respecto a la simulación $B_{sim} = \hat{p} - E_*[\hat{p}^*]$.

Eficiencia relativa. Esta medida proporciona una indicación del sesgo en la aproximación Montecarlo de la varianza con respecto al valor verdadero obtenido por enumeración de las muestras sistemáticas simples (Smith *et al.*, 1995). Esta eficiencia relativa se estimó mediante $eff_D = s_p^2 / V(\hat{p})$, donde s_p^2 es la varianza obtenida por simulación y $V(\hat{p})$ es la varianza obtenida por enumeración de las muestras sistemáticas. La situación estima insesgadamente la varianza del estimador de la incidencia de plantas positivas si $eff_D = 1$, esto es, la estimación mediante simulación es igual a la estimación verdadera, valores mayores a 1 indican que la simulación sobrestima la varianza y valores menores de 1 indican que la simulación subestima esta varianza.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
2	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h
3	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p
4	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t
5	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
6	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h
7	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o		i	j	o	p
8	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t
9	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
10	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h
11	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p
12	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t
13	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
14	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h
15	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p
16	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t
17	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
18	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h	e	f	g	h
19	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p	i	j	o	p
20	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t	q	r	s	t

} l

Hileras
↓

Árboles →

k

Figura 3. Enumeración de las 16 muestras sistemáticas simples que se pueden obtener con un tamaño de muestra de 5 hileras con 5 árboles cada una. Cada una de las 16 muestras posibles está indicada con una letra.

5. Literatura citada

Allen, R. N. 1977. The spread of bunchy top disease within a banana plantation subject to rouging. New South Wales Department of Agriculture, Biology Branch, Plant Disease Survey 1975-76: 25-25.

- Azzimonti R., J. C. 2005. La concordancia entre dos test clínicos para casos binarios: problemas y solución. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 39: 435-444.
- Bellhouse, D. R. 1977. Some optimal designs for sampling in two dimensions. *Biometrika* 64: 605-611.
- Ben-Ze'ev, I. S., M. Bar-Joseph, Y. Nitzan, and R. Marcus. 1989. A severe *Citrus tristeza virus* isolate causing the collapse of trees of sour orange before virus is detectable throughout the canopy. *Annals of Applied Biology* 114: 293-300.
- Bishop, Y. M. M., S. E. Fienberg and P. W. Holland. 1975. *Discrete multivariate analysis: theory and practice*. Cambridge, Massachusetts. MIT Press.
- Brown, L. D., T. T. Cai and A. DasGupta. 2001. Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science* 16: 101-133.
- Cambra, M., E. Camarasa, M. T. Gorris, S. Garnsey, D. J. Gumpf, and M. C. Tsai. 1993. Epitope diversity of *Citrus tristeza virus* isolates in Spain, pp. 219-227. *In: 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, California.
- Cambra, M., M. R. Gorris, C. Marroquín, M. P. Román, A. Olmos, M. C. Martínez, A. Hermoso de Mendoza, A. López, and L. Navarro. 2000a. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the valencian community of Spain. *Virus Research* 71: 85-95.
- Cambra, M., M. T. Gorris, M. P. Román, E. Terrada; S. N. Garnsey. E. Camarasa, A. Olmos, M. Colomer. 2000b. Routine detection of citrus tristeza virus by direct immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies, pp. 34-41. *In: 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologist*. da Graça, J. V.; Lee, R. F.; Yokomi, R. K. (Eds.). Riverside, California.
- Campbell, C. L., and L. V. Madden. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley and Sons. New York. 532p.

- Copes, W. E., H. Scherm, and G. O. Ware. 2001. Sequential sampling to assess the incidence of infection by *Monilinia vaccinni-corymbosi* in mechanically harvested rabbiteye blueberry fruit. *Phytopathology* 91: 348-353.
- Cressie, N. 1993. *Statistics for spatial data*. John Wiley and Sons. 928p.
- D’Orazio, M. 2003. Estimating the variance of the sample mean in two-dimensional systematic sample. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics* 8: 280-295.
- Diario Oficial de la Federación, 2003. Reconversión productiva, integración de cadenas agroalimentarias y de pesca. 25 de julio de 2003.
- Ferrandino, F. J. 2004. Measuring spatial aggregation in binary epidemics: correlative analysis and the advantage of fractal-based sampling. *Phytopathology* 94: 1215-1227.
- Fritz, J. M. and R. S. Waimier. 2001. Examining diagnostic test: an evidence-based perspective. *Physical Therapy* 81: 1546-164.
- Goldberg, J. D. and J. T. Wittes. 1978. The estimation of false negatives in medical screening. *Biometrics* 34: 77-86.
- Góngora C., C. C. 2004. Regionalización, riesgo de establecimiento y caracterización espacial de focos del citrus tristeza closterovirus en Tamaulipas, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Tex. Edo. de México. 145p.
- Gottwald, T. R., S. M. Richie, and C. L. Campbell. 1992. LCOR2-Spatial correlation analysis software for the personal computer. *Plant Disease* 96: 213-215.
- Gottwald, T. R., S. M. Garnsey, M. Cambra, P. Moreno, M. Irej, and J. Borbon. 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of *Citrus tristeza virus*. *Fruits* 52: 397-404.
- Gottwald, T. R., S. M. Garnsey, and J. Borbón. 1998. Increase and pattern of spread of *Citrus tristeza virus* infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphids, *Toxoptera citricidus*. *Phytopathology* 88: 621-636.

- Gottwald, T. R., G. J. Gibson, S. M. Garnsey, and M. Irey. 1999. Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of *Citrus tristeza virus* spread by stochastic modeling. *Phytopathology* 89: 603-608.
- Greenhalgh, T. 1997. How to read a paper: papers that report diagnostic or screening test. *British Medical Journal* 315: 540-643.
- Hermoso de Mendoza, A., J. F. Ballester O., and L. J. A. Pina. 1988. Comparative aphid transmission of a common citrus tristeza virus isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain, pp. 68-70. *In*: 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologist. Riverside, California.
- Huges, G., N. McRoberts, L. V. Madden, and T. R. Gottald. 1997. Relations between incidence at two levels in a spatial hierarchy. *Phytopathology* 87: 542-550.
- Hughes, G., and T. R. Gottwald. 1998. Survey methods for assessment of *Citrus tristeza virus* incidence. *Phytopathology* 88: 87-723.
- Hughes, G., and T. R. Gottwald. 1999. Survey methods for assessment of *Citrus tristeza virus* incidence when *Toxoptera citricida* is the predominant vector. *Phytopathology* 88: 87-723.
- Knottnerus, J. A., C. van Weel, J. M. M. Muris. 2002. Evaluation of diagnostic procedures. *British Medical Journal* 324: 477-480.
- Loeza K., E. 2003. Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del citrus tristeza closterovirus. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Tex. Edo. de México. 85p.
- Laranjeira, F. F., A. B. Filho, L. Amorin, and T. R. Gottwald. 2004. Dinâmica especial da clorose variegada dos citricos em três regioes do estado de Sao Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 29: 56-65.
- Madden, L. V. and G. Hughes. 1999. An effective sample size for predicting plant disease incidence in a spatial hierarchy. *Phytopathology* 89: 770-781.
- Marcus, R., S. Fishman, H. Talpaz, R. Solomon, and M. Bar-Joseph. 1984. On the spatial distribution of the *Citrus tristeza virus* disease. *Phytoparasitica* 12: 45-52.

- Naranjo, S. E., and W. D. Hutchison. 1997. Validation of arthropod sampling plans using resampling approach: software and analysis. *American Entomologist* 43: 48-57.
- Nelson, S. C. 1996. A simple analysis of disease foci. *Phytopathology* 86: 332-339.
- Ridout, M. S. and X. M. Xu. 2000. Relationships between several quadrat-based statistical measures used to characterize spatial aspects of disease incidence data. *Phytopathology* 90: 568-575.
- Rodoni, B. C., G. Hepworth, C. Richardson, and J. R. Moran. 1994. The use of sequential batch testing procedure and ELISA to determine the incidence of five viruses in Victorian cut-flower Sim carnations. *Australian Journal of Agricultural Research* 45: 223-230.
- Sackett, D. L., and R. B. Haynes. 2002. The architecture of diagnostic research. *British Medical Journal* 324: 539-541.
- SAGARPA. 2002. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. 909p.
- Sim, J. and C. C. Wright. 2005. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Physical Therapy* 85: 257-268.
- Sitter, R. R. 1992. A resampling procedure for complex survey data. *Journal of the American Statistical Association* 87: 755-765.
- Smith, D. R., M. J. Conroy, and D. H. Brakhage. 1995. Efficiency of adaptive cluster sampling for estimating density of wintering waterfowl. *Biometrics* 51: 777-788.
- Smith, D. M. and M. S. Ridout. 1995. Remark AS R93: A remark on algorithm AS 189: Maximum likelihood estimation of the parameters of the beta binomial distributions. *Applied Statistics* 44: 545-547.
- Thresh, J. M. and G. K. Owusu. 1986. The control of cocoa swollen shoot disease in Ghana: an evaluation of eradication procedures. *Crop Protection* 5: 41-52.
- Wolter, K. M. 1985. An introduction to variance estimation. Springer-Verlag, New York. 250p.

Capítulo I

SENSIBILIDAD DE INMUNOIMRESION-ELISA Y DAS-ELISA EN EL DIAGNOSTICO Y MUESTREO DE *Citrus tristeza virus* EN HUERTOS COMERCIALES DE TAMAULIPAS, MEXICO

N. Ruiz-García¹; G. Mora-Aguilera¹; D. Ochoa-Martínez¹; G. Ramírez-Valverde²

¹Programa de Fitopatología, ²Estadística. Colegio de Postgraduados; 56230, Montecillo,
Estado de México.

Artículo en arbitraje en: Revista Chapingo serie Horticultura

Capítulo I

SENSIBILIDAD DE INMUNOIMPRESION-ELISA Y DAS-ELISA EN EL DIAGNOSTICO Y MUESTREO DE *Citrus tristeza virus* EN HUERTOS COMERCIALES DE TAMAULIPAS, MEXICO

N. Ruiz-García¹; G. Mora-Aguilera^{1¶}; D. Ochoa-Martínez¹; G. Ramírez-Valverde²

¹Programa de Fitopatología, ²Estadística. Colegio de Postgraduados; 56230, Montecillo, Estado de México. Correo-e: morag@colpos.mx (¶autor responsable).

1.1. RESUMEN

El *Citrus tristeza virus* (CTV) causa una enfermedad de interés regulatorio para la citricultura mexicana. El diagnóstico y un muestreo oportuno y confiable es esencial para aplicar estrategias de manejo ante el avance en territorio nacional del pulgón café, su principal vector. Con el fin de contar con un método eficaz y eficiente para el muestreo y detección del CTV, se evaluó el desempeño del método de inmunopresión-ELISA con respecto al método oficial de diagnóstico DAS-ELISA, debido a su economía, facilidad y rapidez. Con este propósito se evaluaron 7411 árboles, considerando la edad del brote y de infección, provenientes de 11 huertos comerciales de naranja en Tamaulipas. El método de inmunopresión-ELISA superó en sensibilidad y capacidad de pronóstico de positivos a DAS-ELISA en el diagnóstico de árboles con infección reciente o desconocida del CTV ($P \leq 0.028$). La disposición de brotes positivos en el dosel fue heterogénea siendo descrito por la función beta binomial ($P \leq 0.16-0.23$). Con base en esta función y la reproducibilidad de los resultados de impresiones dobles por pecíolo (93.2 %) se sugiere un tamaño óptimo de muestra de 10 pecíolos por árbol en impresiones simples. Este método fue 54.9 % más económico que DAS-ELISA y los diagnósticos se realizaron en una sexta parte del tiempo requerido en esta última prueba. Por esta razón y debido al requerimiento de la norma oficial mexicana vigente (NOM-031-FITO-2000), se recomienda el

método de inmunopresión-ELISA como un método rápido para discriminar árboles positivos en muestreos de campo que deben posteriormente ser verificados por el método oficial de diagnóstico.

Palabras clave adicionales: *Citrus sinensis*, virus, serología, diagnóstico

RELIABILITY OF DIRECT TISSUE BLOT-ELISA AND DAS-ELISA IN THE DETECTION OF *Citrus tristeza virus* DETECTION AND SAMPLING IN COMERCIAL GROVES IN TAMAULIPAS, MEXICO

1.2. ABSTRACT

The *Citrus tristeza virus* (CTV) cause a disease of regulatory interest for the Mexican citriculture. An oportune and reliable sampling and diagnosis is essential to apply management strategies upon the national advance territory of the brown citrus aphid, its main vector. In order to establish an effective and efficient method for CTV detection, it was compared the performance of direct tissue blot immunoassay-ELISA with respect to DAS-ELISA, the official method for diagnosis, due to its economy and operational feasibility. To compare direct tissue blot immunoassay a total of 7421 trees of 11 commercial orchards of Tamaulipas, grouped by buds and infection age were tested. The direct tissue blot immunoassay technique increased the sensitivity and concordance with respect to DAS-ELISA in the diagnosis of recent and unknown-infected trees with CTV ($P \leq 0.029$). The positive buds were heterogeneously distributed throughout the canopy and were well described by the beta binomial function ($P \leq 0.16-0.23$). Based on this function and the reproducibility (93.2 %) of the results of double petiole printing suggested an optimal sample size of 10 petioles in single print. This method was 54.9% more economic than DAS-ELISA and the diagnoses require only 17 % on the time invested for DAS-ELISA. However, due to the current Mexican official norm requirement (NOM-031-

FITO-2000), this method is recommended as a fast technique to discriminate positive trees in field samplings being further verified by the official diagnosis method.

Additional key words: *Citrus sinensis*, virus, serology, diagnosis

1.3. INTRODUCCION

En México, el diagnóstico del *Citrus tristeza virus* (CTV) en programas oficiales de muestreo y erradicación se realiza con el método serológico DAS-ELISA (double-antibody sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay). Los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 empleados son capaces de detectar la mayoría de los aislamientos mexicanos del CTV (Cambra *et al.*, 1993). Este método serológico discrimina la mayoría de las plantas con virus de aquellas sin el virus (Mathews *et al.*, 1997). Sin embargo, por el procesamiento de una gran cantidad de muestras en una campaña fitosanitaria, este método es costoso porque requiere de uso intensivo de laboratorio, equipo y participación de personal acreditado. Adicionalmente, retrasa el diagnóstico por la gran cantidad de tiempo requerido para el procesamiento del tejido vegetal (Cambra *et al.*, 2000). La disponibilidad comercial del método de inmunopresión-ELISA ha resuelto el problema de la infraestructura y oportunidad en el diagnóstico (Cambra *et al.*, 2000). Sin embargo, en México se conoce sólo un estudio de validación de inmunopresión-ELISA (Loredo y Peña, 2002). Por el contrario, se han realizado estudios de reacción específica de aislamientos severos con DAS-ELISA (Silva *et al.*, 2001), así como estudios comparativos de calidad de antisueros comerciales en condiciones de laboratorio (Iracheta *et al.*, 2005). En objetivo del presente trabajo fue determinar el desempeño (sensibilidad, capacidad de pronóstico y concordancia) del método de inmunopresión-ELISA con respecto a DAS-ELISA, así como determinar las condiciones de operación: edad del brote, tiempo transcurrido desde la infección y número de brotes por muestra, con el fin de contar con una alternativa al método DAS-ELISA que sea confiable, económica y oportuna en el diagnóstico del CTV en plantaciones comerciales de cítricos.

1.4. MATERIALES Y METODOS

1.4.1. Colecta de tejidos

Cada muestra consistió de seis a ocho brotes tiernos por árbol con al menos dos hojas de la parte media del brote, colectados uniformemente en la periferia del dosel de cada árbol a una altura de 1.5 metros. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno debidamente etiquetadas y trasladaron al Laboratorio Acreditado de diagnóstico de CTV del Comité para el Fomento de la Citricultura del Estado de Tamaulipas (CFICET), donde se guardaron a 4 °C hasta su proceso. Las muestras se clasificaron por su historial con respecto a la infección de CTV. Positivos históricos: Esta población consistió de 157 árboles positivos identificados previamente empleando DAS-ELISA (Cuadro 1.1). Negativos históricos: Una población de 3200 árboles negativos verificadas mediante DAS-ELISA en por lo menos dos censos anteriores (Cuadro 1.2). Infección desconocida: Una población de 4054 árboles ubicados en el área de influencia de nueve hileras por 49 árboles de un foco de dispersión (Cuadro 1.2). Esta área se estimó con autocorrelación espacial empleando el software LCOR2 Ver 1.3C (Gottwald *et al.*, 1992), con los censos realizados hasta abril de 2003 en la huerta L1. La incidencia y la fecha de detección solo se conocieron en el árbol de referencia.

1.4.2. Análisis serológicos

El análisis serológico de las muestras se realizó en el Laboratorio Acreditado para el diagnóstico de CTV, ubicado en las instalaciones del CFICET. Las muestras se analizaron simultáneamente, empleando seis a ocho pecíolos de hojas para el diagnóstico con inmunopresión-ELISA en su modalidad directa (Garnsey *et al.*, 1993) y la corteza de los mismos brotes para el diagnóstico con DAS-ELISA en su modalidad directa (Garnsey y Cambra, 1991).

DAS-ELISA. Una porción de corteza equivalente a 0.5 g se maceró por 30 segundos en un molino de rodillos para tejidos (Dayton Electric[®]), recolectando el extracto con 2 ml del amortiguador de extracción [8 mM Na₂ HPO₄, 1.4 mM K₂ HPO₄, 137 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.1 % Tween-20 pH 7.4, + (2 % de Polivinilpirrolidona + 0.02 % de albúmina de huevo)]. La cobertura de las placas de microtitulación de poliestireno (MaxiSorp[®], Nulge Nunc Internacional, Dinamarca) se realizó con la mezcla de anticuerpos 3DF1 + 3CA5 (Agdia CAB78900) a una dilución de 5 µl·ml⁻¹ de amortiguador de cobertura (15 mM NaHCO₃ + 30 mM NaCO₃ pH 9.6). Se incubaron por cuatro horas a 28 °C y lavaron en tres ocasiones con PBS-Tween (8mM Na₂ HPO₄, 1.4 mM K₂ HPO₄, 137 mM NaCl, 2.5 mM KCl + 0.1 % Tween-20, pH 7.4). Este lavado se repitió después de cada incubación. Se emplearon 100 µl de extracto por cada pozo con dos repeticiones por muestra y se incubaron por dos horas a 28 °C. El conjugado enzimático empleado fue el anticuerpo de cabra anti-ratón de Agdia Inc. a una dilución de 5 µl·ml⁻¹ en el amortiguador de conjugado (PBS-Tween pH 7.4 + 0.2 % de albúmina de suero bovino + 2 % de PVP-40). Las placas se incubaron por dos horas a 28 °C. Para el revelado de las placas se añadió 1 mg·ml⁻¹ del sustrato p-nitrofenil fosfato disuelto en el amortiguador de revelado (10.2 mM MgCl + 923 mM de dietanolamina). Los controles positivos y negativos fueron extractos de corteza de brotes de plantas de naranja Valencia/agrio mantenidas en invernadero para producción certificada del CFICET. Las lecturas de densidad óptica a 405 nm (OD405) mayores a tres veces la media de dos testigos negativos, después de una hora de reacción fueron consideradas como positivas.

Inmunoimpresión-ELISA. La impresión de los pecíolos se realizó individualmente presionando los mismos en dos sitios contiguos sobre una membrana de nitrocelulosa de 13 × 7 cm, previo corte transversal con tijera. La membrana se bloqueó con una solución de 1 % de albúmina de suero bovino en agua destilada. Se incubó por una hora a temperatura ambiente, al término del cual se lavó con el amortiguador de lavado agitándola durante cinco minutos. El lavado se repitió al término de cada incubación que se realizó a temperatura ambiente. Sobre la membrana se añadió una mezcla de anticuerpos monoclonales (3DF1+3CA5 acoplados a biotina) y se incubó por dos horas. Después del lavado se

añadió el conjugado (fosfatasa alcalina acoplado a estreptavidina) y se incubó por una hora. Se empleó $0.1 \mu\text{m}\cdot\text{ml}^{-1}$ de anticuerpo y conjugado disuelto en amortiguador de conjugado a pH de 7.2. Los anticuerpos y el conjugado fueron adquiridos de Plant Print Diagnostic, SL. Valencia, España. Para el revelado de las membranas se añadió una pastilla (2 g) del sustrato precipitante (nitroblue de tetrazolio y bromo-cloro indolil fosfato, NBT-BCIP) disuelto en 10 ml de agua destilada. Se incubó a temperatura ambiente hasta que aparecieron precipitados de color violeta en los controles positivos, lo cual ocurrió entre 15 y 20 minutos. La reacción se detuvo en la membrana aplicando la solución de lavado y agitando el recipiente durante cinco minutos. Las membranas se secaron con papel absorbente a temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron con una magnificación de $10\times$ empleando un microscopio estereoscópico, considerando como positivos al CTV, aquellas impresiones que mostraron precipitados de color violeta en la región correspondiente al haz vascular del pecíolo (Cambra *et al.*, 2000).

1.4.3. Comparación de inmunopresión-ELISA con positivos históricos

La comparación consistió en diagnosticar simultáneamente, con ambos métodos de diagnóstico, la población de 157 árboles positivos históricos, empleando los índices de sensibilidad (proporción de positivos verdaderos dado que están infectados), predictivo de positivos (proporción de positivos verdaderos entre los que fueron diagnosticados como tales) y de concordancia (proporción de diagnósticos coincidentes) para medir del desempeño de inmunopresión-ELISA (Greenhalgh, 1997). Un intervalo de confianza del $100(1 - \alpha)\%$ para los índices estimados se obtuvo empleando $[B(\alpha/2; x, n - x + 1), B(\alpha/2; x + 1, n - x)]$, donde $B(a; m_1, m_2)$ denota el cuantil α -ésimo de la distribución beta (Brown *et al.*, 2001). Adicionalmente, las muestras se agruparon en dos edades de pecíolo (≤ 1 mes y ≥ 6 meses). La proporción de positivos en ambas edades se comparó con el estadístico χ^2 -cuadrada en su versión de máxima verosimilitud (G^2). El análisis serológico con DAS-ELISA se realizó combinando en una sola muestra la corteza de los seis a ocho brotes colectados por árbol.

1.4.4. Comparación de inmunoimpresión-ELISA en muestras negativas e infección desconocida

Se empleó el mismo procedimiento usado con los árboles positivos históricos, aplicándolo a la población de 3200 árboles negativos previos y 4054 árboles de infección desconocida. Dado que se carecía de información sobre la infección verdadera de los árboles al momento del muestreo, sólo fue posible estimar la sensibilidad de cada método (Johnson y Pearson, 1999). Sea d_j ($j = 1, 2$) el número de muestras positivas detectadas con el método de diagnóstico j y sea b el número de muestras positivas coincidentes con ambos métodos de diagnóstico. La sensibilidad para cada método de diagnóstico es $\hat{p}_1 = bd_2^{-1}$ y $\hat{p}_2 = bd_1^{-1}$ si $d_1, d_2 \neq 0$, con varianzas: $s_{\hat{p}_1}^2 = n^{-1}[\hat{p}_1(1 - \hat{p}_1)\hat{p}_2^{-1}]$ y $s_{\hat{p}_2}^2 = n^{-1}[\hat{p}_2(1 - \hat{p}_2)\hat{p}_1^{-1}]$. La sensibilidad total estimada aplicando ambos métodos de diagnóstico es $\hat{p} = \hat{p}_1 + \hat{p}_2 - \hat{p}_1\hat{p}_2$ con varianza $s_{\hat{p}}^2 = [\hat{p}(1 - \hat{p})(\hat{p}_1 + \hat{p}_2)](n\hat{p}_1\hat{p}_2)^{-1}$ (Goldberg y Wittes, 1978). La sensibilidad estimada con cada método de diagnóstico en cada antecedente de infección se comparó empleando la aproximación normal para comparar dos proporciones. La concordancia entre ambos métodos de diagnóstico se midió con el índice kappa (Sim y Wright, 2005). El diagnóstico del CTV mediante DAS-ELISA se realizó con muestras compuestas de cuatro árboles. Cuando una muestra compuesta resultó positiva se analizaron las muestras individuales correspondientes para identificar al árbol(es) positivo(s).

1.4.5. Estimación del número de pecíolos por muestra

La redundancia en la información proporcionada por el empleo de brotes dispuestos en agregados en el dosel de un árbol se estimó con el tamaño efectivo de muestra. Se tomó una muestra de $n = 6$ brotes en N árboles positivos. Cuando la disposición de los brotes positivos alrededor de los árboles es homogénea, la probabilidad de que un árbol tenga al menos un brote positivo es $\hat{p}_{arbol+} = 1 - (1 - \hat{p}_{brote})^n$, donde $\hat{p}_{brote} = (\sum_{i=1}^N \hat{p}_{brote,i})N^{-1}$ es la

proporción media de brotes positivos por árbol. Cuando la disposición de los brotes positivos alrededor de los árboles es heterogénea, la probabilidad de que un árbol tenga al menos un brote positivo es $\hat{p}_{arbol+} = 1 - \prod_{i=0}^n (1 - \hat{p}_{brote} + i\hat{\theta}) \cdot (1 + i\hat{\theta})^{-1}$, donde $\hat{\theta}$ es el índice de agregación de la distribución beta binomial. Cuando la disposición de los brotes es heterogénea, en una muestra de n brotes, el número de brotes diferentes que proporcionan información sobre la infección viral es $n_{def} = \sum_{i=1}^n \ln[(1 - \hat{p}_{brote} + i\hat{\theta})(1 + i\hat{\theta})^{-1}] \ln(1 - \hat{p}_{brote})^{-1}$ (Madden y Hughes, 1999). La bondad de ajuste de las frecuencias de brotes positivos se realizó por antecedente de infección con el estadístico χ^2 -cuadrada. El parámetro θ se estimó con el algoritmo AS R93 (Smith y Ridout, 1995).

1.5. RESULTADOS

1.5.1. Comparación de inmunopresión-ELISA en árboles positivos históricos

La confirmación con ambos métodos de diagnóstico de los 157 árboles positivos históricos fue coincidente en 150 árboles (95.54 %), observándose sólo siete muestras discordantes (Cuadro 1.3). Cuatro muestras fueron negativas por DAS-ELISA (absorbancias de 0.052 a 0.120, control = 0.152) y positivas por inmunopresión-ELISA (dos a cuatro pecíolos positivos), mientras que tres muestras fueron positivas por DAS-ELISA (absorbancias: 0.232, 0.481, 0.823, control = 0.152) y negativas por inmunopresión-ELISA. Únicamente una muestra de la huerta M1 fue negativa por ambos métodos de diagnóstico (absorbancia = 0.082). El 98.03 % de las muestras infectadas fueron positivas con inmunopresión-ELISA, por lo que el 1.98 % fueron falsos negativos. Además, el 97.39 % de las muestras que proporcionen un resultado positivo con inmunopresión-ELISA realmente estarían infectados. La proporción de positivos detectados con DAS-ELISA e inmunopresión-ELISA fue igual en ambas edades de pecíolos, $P \leq 0.294$ y $P \leq 0.551$, respectivamente.

1.5.2. Comparación de inmunopresión-ELISA en muestras negativos e infección desconocida

El número de árboles positivos detectados en cada antecedente de infección se muestra en el Cuadro 1.4. En el antecedente de infección desconocida se identificaron cinco muestras discordantes: un árbol fue positivo por DAS-ELISA (absorbancia = 0.197, control = 0.148) y negativo por inmunopresión-ELISA, y cuatro árboles positivos por inmunopresión-ELISA (dos impresiones positivas) y negativos por DAS-ELISA (absorbancias: 0.031, 0.075, 0.143, 0.146, control = 0.148). La concordancia entre ambos métodos de diagnóstico fue $\kappa = 0.927 \pm 0.015$ ($P < 0.05$). La sensibilidad estimada para inmunopresión-ELISA fue mayor que para DAS-ELISA ($P \leq 0.029$). En el antecedente de infección reciente se identificaron seis muestras discordantes: positivos por inmunopresión-ELISA (dos impresiones positivas) y negativos por DAS-ELISA (absorbancias de 0.040 a 0.095, control = 0.146). La concordancia entre ambos métodos de diagnóstico fue $\kappa = 0.962 \pm 0.018$ ($P < 0.05$). La sensibilidad estimada para inmunopresión-ELISA fue mayor que para DAS-ELISA ($P \leq 0$). Empleando ambos métodos de diagnóstico se mejora la sensibilidad del programa de diagnóstico y se reduce la proporción de falsos negativos. En ambos antecedentes de infección, inmunopresión-ELISA fue más sensible para identificar las muestras positivas al CTV.

1.5.3. Estimación del número de pecíolos por muestra

La disposición de los brotes positivos en la periferia de un árbol no fue homogénea (Cuadro 1.5). La mayor cantidad de pecíolos con información redundante sobre la infección viral se estimó en el antecedente de infección desconocida, en la cual se estimó también el mayor índice de agregación (Figura 1.1, Cuadro 1.5). La menor cantidad de pecíolos con información redundante se estimó en el antecedente de árboles positivos históricos, en la cual, incluso la disposición de los brotes positivos alrededor de un árbol puede considerarse homogénea (Cuadro 1.5, Figura 1.1).

1.6. DISCUSION

Entre los métodos serológicos disponibles para el diagnóstico de CTV, DAS-ELISA es el más aceptado, y en México constituye el método oficial para el diagnóstico de CTV (NOM-031-FITO-2000). Sin embargo, el método de inmunopresión-ELISA mostró la misma sensibilidad que DAS-ELISA en el diagnóstico de este virus empleando árboles positivos históricos y mayor sensibilidad en muestras de infección reciente, así como en aquellas de antecedente desconocido, que correspondería al caso real de detección de CTV en México y en otras regiones con un programa regulatorio análogo. Estos resultados concordaron, en general, con los obtenidos en Veracruz en un estudio comparativo con árboles adultos de infección viral conocida (Loredo y Peña, 2002). Sin embargo, éstos últimos autores no reportaron indicadores de desempeño (sensibilidad y concordancia) y el muestreo no fue exhaustivo, por lo que la comparación fue de tipo cualitativo. Resultados similares se obtuvieron en España con anticuerpos convencionales y recombinantes en 23 árboles también de infección conocida (Terrada *et al.*, 2000) y en Turquía empleando anticuerpos monoclonales y policlonales en 258 árboles de infección desconocida (Korkmaz, 2002). Con los resultados reportados en estos dos últimos trabajos se estimó la sensibilidad y concordancia, resultando en ambos casos una sensibilidad y exactitud de 100 %. Considerando que ambos métodos emplean el mismo principio antigénico, la diferencia en la sensibilidad puede deberse al efecto de dilución en muestras compuestas para DAS-ELISA, afectando la detección de árboles con infecciones recientes o muy prolongadas. Esto por efecto de la baja concentración (Mathews *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2005) y/o disposición heterogénea del virus en el dosel de la planta (Ballesteros *et al.*, 1993; Ben-Ze'ev *et al.*, 1989). Aunado a la confiabilidad (sensibilidad y concordancia), el método serológico de inmunopresión-ELISA ha resuelto algunos problemas documentados en DAS-ELISA como el costo y el tiempo respuesta (Cambra *et al.*, 2000). El costo por muestra en el presente trabajo, considerando todo el proceso y costo de reactivos, con DAS-ELISA fue de US\$ 1.72 contra US\$ 0.98 de inmunopresión-ELISA, lo que representó un ahorro de 57.5 %. En un reporte previo se mostró un ahorro del 66 % en el análisis de árboles adultos (Loredo y Peña, 2002). En el caso de inmunopresión-

ELISA, las dos impresiones por brote fueron reproducibles en 93.2 %, por lo cual se sugiere realizar una impresión por pecíolo e incrementar la exploración del dosel del árbol con más brotes para compensar la heterogeneidad en la disposición de brotes positivos. Considerando que el número de brotes evaluados por árbol, sin afectar la confiabilidad en la detección, fue de 5 en doble impresión, se propone el empleo de 10 brotes por muestra en impresión simple. Esto reduce los costos del análisis en 17 % e incrementa la probabilidad de incluir brotes positivos en la muestra. La determinación del número óptimo de brotes para detección de árboles con al menos un brote positivo se formalizó por primera vez en este trabajo considerando la distribución beta binomial que permitió determinar la disposición de los brotes positivos alrededor del dosel del árbol. Este resultado confirma cuantitativamente la disposición heterogénea del virus previamente deducido mediante pruebas serológicas y biológicas (Ballesteros *et al.*, 2003; Ben-Ze'ev *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 2000). Inmunoimpresión-ELISA fue más oportuna en el diagnóstico de las muestras que DAS-ELISA, ya que el tiempo promedio para analizar una membrana (127.2 ± 1.02 impresiones, $n = 13$ membranas) fue de un día, mientras que con DAS-ELISA se requirieron seis días, realizando muestras compuestas de cuatro árboles. Por esta característica se ha propuesto el empleo de inmunoimpresión-ELISA directamente en campo por personal con menor grado de especialización (Cambra *et al.*, 2000). Aun cuando el método de inmunoimpresión-ELISA ha mostrado suficiente sensibilidad para el diagnóstico de CTV, es necesario reconfirmar los resultados positivos con DAS-ELISA (método oficialmente reconocido), para poder aplicar las medidas de control oficiales indicadas en la normatividad mexicana vigente. El procedimiento que se sugiere para reducir costos e incrementar la oportunidad en el diagnóstico, manteniendo la confiabilidad de un programa de detección, consistiría en diagnosticar en una primera etapa todas las muestras con inmunoimpresión-ELISA y posteriormente confirmar con DAS-ELISA únicamente las muestras positivas. Con este procedimiento se tendría un error de 2.2 % de falsos negativos y 2.6 % de falsos positivos. Este procedimiento incrementa únicamente el 4.6 % los costos del análisis, y representa un ahorro de 54.9 % del costo empleando DAS-ELISA como único método de diagnóstico.

1.7. CONCLUSIONES

El diagnóstico del CTV con el método serológico de inmunopresión-ELISA fue más sensible que DAS-ELISA y mejora la detección de positivos. Aunque en el antecedente de positivos históricos ambos métodos tuvieron la misma sensibilidad estadística, en el escenario de positivos de infección reciente e infección desconocida, inmunopresión-ELISA fue más confiable. La disposición de los brotes en el dosel de los árboles fue heterogénea, lo cual afectó el desempeño de ambos métodos. Debido a lo anterior y a la reproducibilidad del diagnóstico en un brote, se recomienda un tamaño óptimo de muestra de diez brotes por árbol en impresión simple. El desempeño de ambos métodos no fue afectado por la edad de los brotes empleados, aunque sí lo fue por el tiempo transcurrido desde la infección, siendo el método DAS-ELISA la más afectada. Inmunopresión-ELISA fue 57.5 % más económico y requirió una sexta parte del tiempo empleado en DAS-ELISA. Por las especificaciones de la norma oficial mexicana NOM-031-FITO-2000, se recomienda el método de inmunopresión-ELISA como un método rápido para pre-identificar muestras positivas que deben ser verificados posteriormente por el método oficial de diagnóstico. Este procedimiento representa un ahorro total del 54.9 %.

1.8. AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto recibió apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, No. G35488-B; Fundación Produce-Tamaulipas, A.C. y CFICET. Los autores agradecen el apoyo técnico de la Biol. Doris Hidalgo y el apoyo logístico del personal de la Campaña contra el CTV del COTASAG, Tamaulipas.

1.9. LITERATURA CITADA

Ballesteros O., J. F.; Piña, J. A.; Carbonell, E. A.; Moreno, P.; Hermoso M., A.; Cambra, M.; Navarro, L. 1993. Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology* 42: 219-229.

- Ben-Ze'ev, I. S.; Bar-Joseph, M.; Nitzan, Y.; Marcus, R. 1989. A severe citrus tristeza virus isolate causing the collapse of trees of sour orange before virus is detectable throughout the canopy. *Annals of Applied Biology* 114: 293-300.
- Brown, L. D.; Cai, T. T.; Dasgupta, A. 2001. Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science* 16: 101-133.
- Cambra, M., Camarasa, E.; Gorris, M. T.; Garnsey, S.; Gumpf, D. J.; and Tsai, M. C. 1993. Epitope diversity of *Citrus tristeza virus* isolates in Spain, pp. 219-227. *In*: 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, California.
- Cambra, M.; Gorris, M. T.; Román, M. P.; Terrada, E; Garnsey, S. M.; Camarasa, E.; Olmos, A.; Colomer, M. 2000. Routine detection of citrus tristeza virus by direct immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies, pp. 34-41. *In*: 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologist. da Graca, J. V.; Lee, R. F.; Yokomi, R. K. (Eds.). Riverside, California.
- Garnsey, S. M.; Cambra, M. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens, pp. 193-216. *In*: Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. Roistacher, C. N. (Ed.). FAO, Rome.
- Garnsey, S. M.; Permar, T. A.; Cambra, M.; Herderson, C. T. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of Citrus tristeza virus (CTV), pp. 39-50. *In*: 12th Conference of International Organization of Citrus Virologist. Moreno, P.; da Graca, J. V. (Eds). Riverside, California.
- Greenhalgh, T. 1997. How to read a paper: papers that report diagnostic or screening test. *British Medical Journal* 315: 540-643.
- Goldberg, J. D.; Wittes, J. T. 1978. The estimation of false negatives in medical screening. *Biometrics* 34: 77-86.
- Gottwald, T. R.; Richie, S. M.; Campbell, C. L. 1992. LCOR2-Spatial correlation analysis software for the personal computer. *Plant Disease* 96: 213-215.

- Iracheta C., M. M.; Peña del Río, M.; Rocha P., M. A. 2005. Comparación de antiseros comerciales para la detección del virus tristeza de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 323-328.
- Johnson, W. O.; Pearson, L. M. 1999. Dual screening. *Biometrics* 55: 867-973.
- Korkmaz, S. 2002. Application of direct tissue blot immunoassay in comparison with DAS-ELISA for detection of Turkish isolates of citrus tristeza closterovirus (CTV). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 26: 203-209.
- Loredo S., R. X.; Peña R., M. A. 2002. Validación de la técnica ELISA-Inmunoimpresión para detección de VTC, pp. 189-190. *In: XV Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria*. Villahermosa, Tabasco.
- Madden, L. V.; Hughes, G. 1999. An effective sample size for predicting plant disease incidence in a spatial hierarchy. *Phytopathology* 89: 770-781.
- Matews, D. M.; Riley, K.; Dodds, J. A. 1997. Comparison of detection methods for citrus tristeza virus in field trees during months of nonoptimal titer. *Plant Disease* 81: 525-529.
- Ruiz G., N.; Mora A., G.; Rivas V., P.; Ochoa M., D.; Góngora C., C. C.; Loeza K., E.; Gutiérrez E., A.; Ramírez V., G.; Álvarez R., R. 2005. Probability model of *Citrus tristeza virus* detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA, pp. 196-204. *In: 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologist*. Hilf, M.E.; Duran A., N.; Rocha P., M.A. (Eds.). Riverside, California.
- Silva V., S.; Peña R., M.; Peña M., R.; Villegas J., N.; Byerly M., K. F.; Rocha P., M. A. 2001. Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *Agrociencia* 35: 441-450.
- Sim, J.; Wright, C. C. 2005. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Physical Therapy* 85: 257-268.
- Smith, D. M.; Ridout, M. S. 1995. Remark AS R93: A remark on algorithm AS 189: Maximum likelihood estimation of the parameters of the beta binomial distribution. *Applied Statistics* 44: 545-547.

Terrada, E.; Kerschbaumer, R. J.; Giunta, G.; Galeffi, P.; Himmler, G., Cambra, M. 2000. Fully “recombinant enzyme-linked immunosorbent assays” using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 90: 1337-1344.

Cuadro 1.1. Características de las huertas comerciales con árboles de infección conocida donde se colectaron los tejidos utilizados en el análisis serológico por inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA. Tamaulipas, 2004.

Huertas/ Infección ^z	Variedades	Edad ^x		Muestras ^w	Fecha de colecta (mes/año)	
		Árboles	Brotos		Actual	Históricos
G1	Valencia	20	1	8	09-03	02-02,10-02
G2	Valencia	12	1	10	08-03	09-02,01-03
L1	Valencia	40	1	58	01-04	12-01,3-02,9-02,4-03
M1	Val. Temp. ^y	20	6	62	03-04	12-02,02-03
P1	Val. Temp.	13	1	19	09-03	11-02

^zInicial del municipio (G=Güemes, L=Llera, M=Mante y P=Padilla) y su número de estudio.

^yVal. Temp. = Valencia temprana.

^xLa edad se midió en años (árboles) y meses (brotos)

^wEl número de muestras (seis a ocho brotes) corresponde al número de árboles

Cuadro 1.2. Características de las huertas comerciales con árboles de infección desconocida y reciente donde se colectaron los tejidos utilizados en el análisis serológico por inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA. Tamaulipas, 2004^z.

Huertas/ Infección	Variedades	Edad		Muestras	Fecha de colecta (mes/año)	
		Árboles	Brotos		Actual	Históricos
b) Árboles negativos históricos						
G2	Valencia	12	1	413	01-04	09-02,01-03
L1	Valencia	40	1	384	01-04	12-01,3-02,9-02,4-03
M1	Val. Temp.	20	6	1962	03-04	12-02,02-03
P2	Marrs	12	1	441	03-04	
c) Árboles de infección desconocida						
G1	Valencia	20	6	384	01-04	
G3	Mandarina	10	1	390	03-04	
L2	Val. Temp.	15	1	427	03-04	
L3	Navel	14	1	433	03-04	
P1	Val. Temp.	13	6	1596	01-04	
P3	Valencia	20	1	384	03-04	
V1	Valencia	16	6	440	01-04	

^zLos pie de página corresponde con los indicados en el Cuadro 1.1.

Cuadro 1.3. Concordancia estimada entre inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico de árboles positivos históricos. Tamaulipas, 2004.

DAS	Inmunopresión			Estimación	
	Positivo	Negativo	Total	Sensibilidad	
Positivo	149	3	152	IPP ^z	98.03 (94.34,99.59)
Negativo	4	1	5	Exactitud	97.39 (93.44,99.28)
Total	153	4	157		95.54 (19.41,99.37)

^zIPP = Índice predictivo de positivos

Cuadro 1.4. Sensibilidad estimada de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en la detección de CTV en muestras de infección desconocida.

Método de detección	Antecedente de infección		
	Desconocido	Negativos	
Positivos por DAS-ELISA	46	78	
Positivos por Inmunopresión-ELISA	49	84	
Positivos por ambos	45	78	
Muestras totales	4054	3200	
Sensibilidad estimada			
	$\hat{p}_{DAS-ELISA} \pm es(\hat{p}_{DAS-ELISA})$	0.918 ± 0.004	0.929 ± 0.005
	$\hat{p}_{inmuno-ELISA} \pm es(\hat{p}_{inmuno-ELISA})$	0.978 ± 0.002	1.000 ± 0.000
	$\hat{p} \pm es(\hat{p})$	0.998 ± 0.001	1.000 ± 0.000

Cuadro 1.5. Probabilidad de detectar, con inmunopresión-ELISA, un árbol con al menos un brote positivo a CTV y número de brotes que proporcionaron información sobre la infección. Tamaulipas, 2004.

	Antecedente de infección		
	Histórico	Desconocido	Negativo
Proporción de brotes positivos $\hat{p} \pm es(\hat{p})$	0.576±0.02	0.714±0.04	0.692±0.03
Índice de agregación $\hat{\theta} \pm es(\hat{\theta})$	0.124±0.04	0.387±0.12	0.159±0.06
Número mínimo de brotes por muestra	5.3	3.8	4.8
Probabilidad de detectar un árbol positivo			
Binomial	0.994	0.991	0.999
Beta-Binomial	0.989	0.991	0.996
Bondad de ajuste (valor p de la prueba Ji-cuadrada)			
Binomial	0.0	0.0	0.0021
Beta-Binomial	0.0	0.1559	0.2299

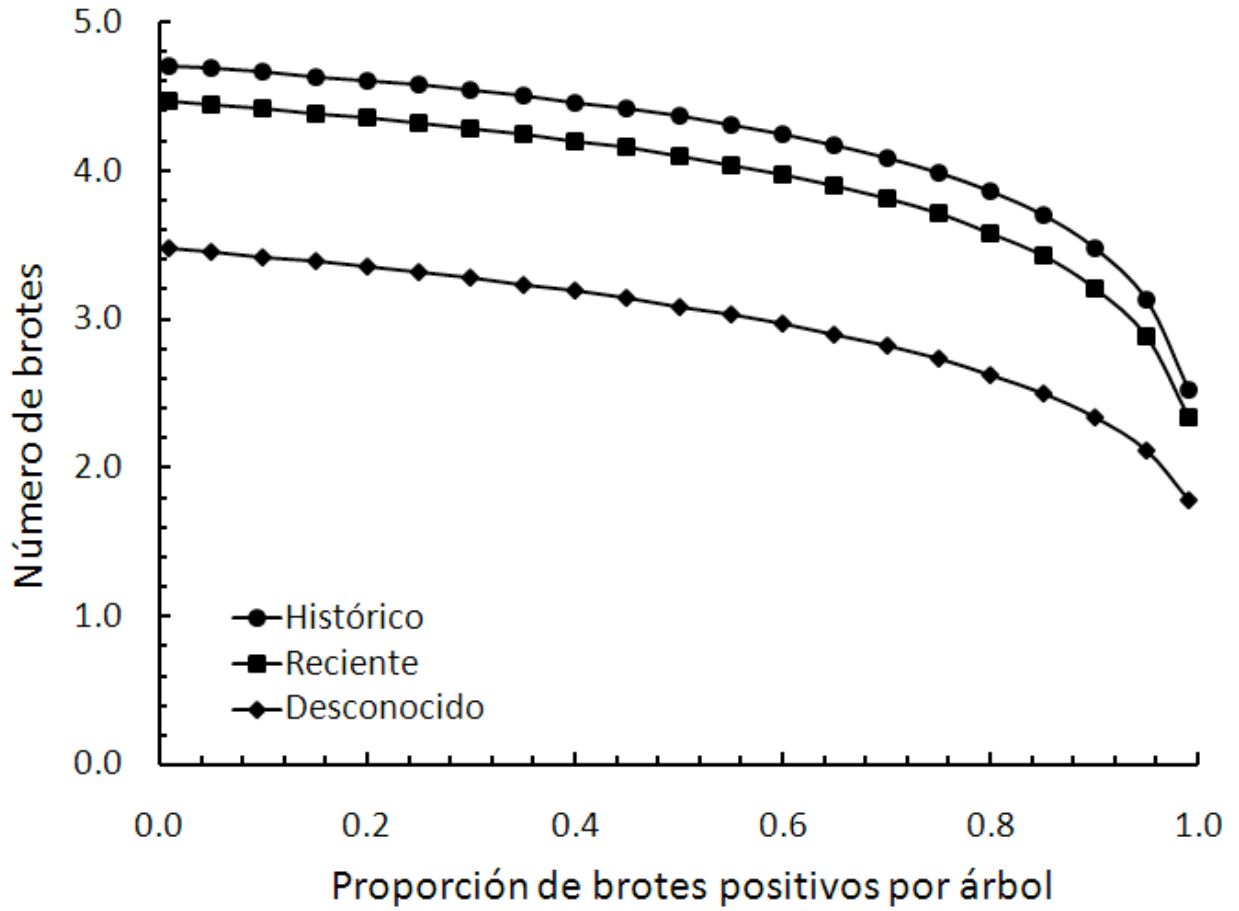


Figura 1.1. Número mínimo de brotes en una muestra para detectar un árbol con al menos un brote positivo a CTV empleando impresiones dobles por pecíolo para la técnica de inmunopresión-ELISA.

Capítulo II

DINAMICA ESPACIO-TEMPORAL DE LA DISPERSIÓN DEL CITRUS TRISTEZA VIRUS EN TAMAULIPAS: IMPLICACIONES EN MUESTREO Y ERRADICACIÓN

Noe **Ruiz-García**¹, Gustavo **Mora-Aguilera**¹, Daniel **Ochoa-Martínez**¹, Gustavo **Ramírez-Valverde**²

¹Programa en Fitopatología, ²Estadística. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados;
56230, Montecillo, Estado de México.

Artículo en arbitraje en:

Capítulo II

DINAMICA ESPACIO-TEMPORAL DE LA DISPERSIÓN DEL CITRUS TRISTEZA VIRUS EN TAMAULIPAS: IMPLICACIONES EN MUESTREO Y ERRADICACIÓN

Noe **Ruiz-García**¹, Gustavo **Mora-Aguilera**¹, Daniel **Ochoa-Martínez**¹, Gustavo **Ramírez-Valverde**²

¹Programa en Fitopatología, ²Estadística. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados; 56230, Montecillo, Estado de México (morag@colpos.mx).

2.1. RESUMEN

Se estudió la dinámica temporal y espacial de la dispersión del *Citrus tristeza virus* (CTV) durante cuatro años en 11 huertos comerciales de naranja Valencia (*Citrus sinensis*) injertados en agrio (*Citrus aurantium*) en Tamaulipas, México. El objetivo fue encontrar elementos que permitan modificar el muestreo y erradicación empleado actualmente en la campaña estatal contra el CTV. La dinámica espacial se caracterizó empleando la distancia al árbol positivo más cercano, autocorrelación espacial y forma de los focos. El 82 % de la dispersión ocurrió dentro del área de dependencia espacial continua en huertas con incidencias mayores a 1 %. El esquema de erradicación actual eliminó al CTV en las huertas con incidencias menores de 1 %. Para que la erradicación de plantas positivas sea viable y efectiva se recomienda diagnosticar los árboles vecinos inmediatos dentro, entre hileras y la diagonal durante el proceso de erradicación y un mes después de realizado éste.

Palabras clave adicionales: DAS-ELISA, áfidos vectores, epidemiología, *Citrus tristeza virus*, *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*.

2.2. INTRODUCCIÓN

La tristeza de los cítricos, enfermedad causada por el *Citrus tristeza virus* (CTV) ha causado la muerte de millones de árboles de cítricos en regiones productoras de Sur y Centroamérica, la cual se ha atribuido a la relación de variantes de tipo severo transmitidos por *Toxoptera citricida* (Kirkardy) (Cambra *et al.*, 2000). Ante este panorama, México mantiene una campaña oficial para la erradicación del CTV y monitoreo del pulgón café (NOM-031-FITO-2000). Las experiencias oficiales en México muestran que, aunque las acciones de erradicación aparentemente han retrasado el establecimiento regional de un patógeno, éstas no han impedido su dispersión, por lo que eventualmente las campañas se han eliminado o adquirido un carácter general fitosanitario. Esto se ha debido, además del costo, a la dificultad inherente a una enfermedad de interés regulatorio con baja prevalencia, lo que dificulta el desarrollo de criterios efectivos de detección y el estudio de mecanismos de dispersión que sustenten el muestreo y el proceso de erradicación. Con respecto al virus de la tristeza, en México se han realizado estudios extensivos sobre diagnóstico, costo y eficiencia de las técnicas serológicas de detección (Silva *et al.*, 2001; Iracheta *et al.*, 2005) pero no se ha estudiado exhaustivamente el muestreo y la epidemiología. A nivel mundial tampoco se ha estudiado el muestreo a pesar de los abundantes trabajos epidemiológicos con respecto a tasas de incremento temporal, patrones de dispersión espacial y el efecto del hábito del vector en éste (Gottwald *et al.*, 1997, 1998, 1999; Marroquín *et al.*, 2004; Yokomi y DeBorde, 2005), con excepción de dos trabajos sobre el efecto de la frecuencia del muestreo en la erradicación viral (Fishman *et al.*, 1983; Marcus *et al.*, 1989). Este trabajo se plantea con el fin de optimizar la operatividad y eficacia de la estrategia de muestreo con fines de detección y erradicación fundamentado en estudios epidemiológicos de la enfermedad. Adicionalmente, pretende proporcionar información epidemiológica actualmente no disponible en México desde la perspectiva del manejo de la enfermedad.

2.3. MATERIALES Y METODOS

2.3.1. Lugar de estudio

El trabajo de campo se realizó en 11 huertos comerciales durante el período de diciembre de 2001 a marzo de 2004. La selección de huertas se realizó previa confirmación serológica con la técnica DAS-ELISA de al menos un árbol positivo al CTV, obtenido con un muestreo sistemático en zig-zag del 10 % de la huerta por la Campaña contra el CTV operada por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal (CESAVET). Se realizaron mapas de campo con base en censos de presencia o ausencia de infección por planta. Los vectores reportados en trabajos previos por orden de abundancia en las huertas de L1, P2 y V1 fueron: *Aphis spiraecola* (Patch.), *Toxoptera aurantii* (Boyer de Folscolombre) y *A. gossypii* (Gaona, 1996).

2.3.2. Censos extensivos y erradicación

El efecto de la erradicación de plantas positivas en la dispersión posterior se estudió en las huertas M1, L1, P2 y V1 (Cuadro 2.1). La erradicación, consistente en la eliminación de los árboles positivos al CTV, fue realizada una vez por el CESAVET en febrero de 2003 en la huerta M1 y en mayo en las huertas L1, P2 y V1, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000.

2.3.3. Censos restrictivos

Con el fin verificar el patrón espacial de 9 hileras por 49 árboles determinado con autocorrelación en la huerta L1 hasta el censo de noviembre de 2002, se seleccionaron 10 focos de dispersión en siete huertas cuya superficie total representó el 10 % del total estatal considerando variedad, número de plantas positivas previas por huerta y superficie de la plantación (Cuadro 2.2). En cada huerto se realizó un censo restringido en torno al área de influencia de un foco de dispersión de 9 hileras por 49 árboles. Los censos se rea-

lizaron del 5 al 27 de enero (G1, G2, P1) y del 3 al 19 de marzo (G3, L2, L3, P3) de 2004.

Cuadro 2.1. Características de cuatro huertos censados para medir la dispersión después de la erradicación de plantas positivas al CTV en naranja. Tamaulipas, 2004.

Huerta [†]	Variedad	Edad	Marco [¶]	Censos	Fecha del censo
L1	Valencia	40	8×8	5	09-01,3-02,9-02,4-03,1-04
M1	Valencia	20	6×8	3	12-02,2-03,3-04
P2	Marrs	12	6×8	2	2-02,1-04
V1	Valencia	16	6×8	2	1-02,1-04

[†]Inicial del municipio donde se ubicó la huerta (L=LLera, M=Mante, P=Padilla, V=Victoria).

[¶]Distancia en metros entre árboles e hileras.

Cuadro 2.2. Características de las huertas censadas restringidamente para validar el patrón espacial de dispersión del CTV.

Huertas [†]	Variedad [¶]	Edad (años)	Fecha de detección [§]	Positivos		Marco
				Total	Selección ^p	
G1	Valencia	20	19/02/02	9	1*	4×6
G2	Valencia	12	27/01/03	9	1	4×6
G3	Mandarina	10	03/04/02	29	1*	2×4×6
L2	Val. Temp.	15	23/04/02	2	1	8×8
L3	Nav. Temp.	14	21/02/02	4	1*	9×9
P2	Val. Temp.	13	26/11/02	40	4	4×8
P3	Valencia	20	22/11/02	4	1	6×8

[†]El pie del cuadro es el mismo que en el Cuadro 2.1.

[¶]Val. Temp.=Valencia Temprana, Nav. Temp.=Navel Temprana.

[§]Fecha de detección de los árboles positivos de referencia.

^pLos asteriscos indican árboles erradicados en mayo de 2003.

2.3.4. Colecta de tejidos y análisis serológicos

Se colectaron seis a ocho brotes vegetativos en la periferia del dosel de cada árbol a una altura promedio de 1.5 m. Se colocaron en bolsas de polietileno de 20×15 cm debidamente etiquetadas y trasladaron al laboratorio del CFICET (Campo para el Fomento de la Investigación Citrícola del Estado de Tamaulipas) donde se guardaron a 4 °C hasta su proceso. El diagnóstico del CTV se realizó con muestras compuestas de cuatro árboles empleando la corteza de los brotes con la técnica serológica de inmunoabsorción enzimática directa (DAS-ELISA) (Garnsey y Cambra, 1991), de acuerdo con el protocolo para CTV de Agdia, Inc. Las muestras con densidad óptica mayores a tres veces la media aritmética de dos testigos negativos fueron consideradas positivas. Cuando una muestra compuesta resultó positiva se analizaron las muestras individuales respectivas con el fin de identificar al árbol(es) positivo(s).

2.3.5. Dinámica espacial de la dispersión del *Citrus tristeza virus*

Se consideraron tres escenarios: huertas censadas con alta (M1, L1) y baja incidencia (P2, V1), y huertas sin censar en las cuales los positivos iniciales fueron ubicados con un muestreo (Cuadro 2.2). Se usaron tres métodos. Distancia al árbol vecino positivo más cercano. Se tienen n árboles positivos en una huerta con hileras espaciados b m y árboles espaciados w metros. La distancia euclidiana ($d_i; i = 1, \dots, n$) entre el árbol i del censo actual y el árbol positivo de referencia más cercano del censo anterior, se obtuvo como $d_1 = w < d_2 = b < d_3 = (w^2 + b^2)^{1/2} < \dots$ suponiendo que $w < b$ (Marcus *et al.*, 1984). Autocorrelación espacial. Las dependencias espaciales continuas se determinaron con el software LCOR2 Ver 1.3C (Gottwald *et al.*, 1992), empleando la incidencia de árboles individuales (Gottwald *et al.*, 1998). Estructura y forma de focos. En cada huerta censada se determinó el número de focos (NF), plantas (NPF_i), hileras (lf_i) y columnas (lc_i) ocupadas por el foco i . Se estimó el índice de compactación $ICF = NPF_i \cdot (lf_i \times lc_i)^{-1}$ y de forma $IFF = lf_i \cdot lc_i^{-1}$ de los focos (Nelson, 1996).

2.3.6. Valoración de la erradicación como estrategia de control

Se consideraron dos escenarios: huertos con alta incidencia (L1, M1) y huertos con baja incidencia de plantas positivas (P2, V1). Para valorar el impacto de la erradicación en la dispersión del CTV después de realizado éste, se compararon las tasas de dispersión de la enfermedad antes y después de la erradicación, así como las distancias a partir de los árboles erradicados a las que fueron detectados árboles positivos en censos posteriores.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Dinámica espacial de la dispersión del *Citrus tristeza virus*

El 58.8 % de la dispersión observada en la huerta L1 a partir de los positivos de octubre de 2001 ocurrió en árboles vecinos que distaron 8 y 11.3 m. El 52.9 % distaron 8 m (66.6 % dentro de hileras y 33.4 % entre hileras) y sólo 5.9 % en la diagonal (Cuadro 2.3, Figura 2.1A). La dependencia espacial continua fue de orden 2 hileras (16 m), orden 3 árboles (24 m) y orden 1 en dirección diagonal (11.3 m) (Figura 2.1D), conteniendo el 82.3 % de la dispersión. La dispersión en la huerta M1 en febrero de 2003 a partir de los positivos de diciembre de 2002 fue mayor (16.7 %) en los vecinos de la diagonal (10 m) que la dispersión dentro y entre hileras (6.7 %) (Cuadro 2.3, Figura 2.1B). La dependencia espacial continua fue de orden 1 hilera (8 m), orden 2 árboles (12 m) y orden 2 (20 m) en la diagonal (Figura 2.1E), conteniendo el 65.1 % de la dispersión. La dispersión en marzo de 2004 fue similar, el 24.31 % de la dispersión fue en los árboles vecinos de la diagonal (10 m) mientras que el 10.8 % de la dispersión ocurrió en árboles dentro y entre hileras (Cuadro 2.3, Figura 2.1C). La dependencia espacial continua fue de orden 1 hilera (8 m), orden 4 árboles (24 m) y orden 1 (10 m) en dirección diagonal (Figura 2.1E), conteniendo el 89.4 % de la dispersión. El índice de compactación de focos también indicó dispersión al vecino más cercano ($ICF=0.5$), al incrementar de 4.48 % a 15.36 % en febrero de 2002 a marzo de 2003 (Figura 2.2A). El índice de forma de focos indicó que la dispersión ocurre en focos asimétricos de dos hileras y tres árboles ($IFF=0.667$) al incre-

mentar 6.75 %, y simétricos de dos hileras con dos árboles (IFF=0.5) al incrementar 6.75 % (Figura 2B). En torno al único árbol positivo de la huerta P2 se detectaron seis positivos nuevos dentro de la misma hilera, dos árboles antes (6, 12 m) y cuatro después (6, 12, 24 m) del positivo de referencia. En contraste, en las huertas donde el positivo de referencia fue identificado con un muestreo del 10 %, sólo en tres huertas (L2, G1, G3) se detectaron más de cinco positivos dispuestos en el rango de dispersión observada (Cuadro 2.4). En las otras cuatro huertas (7 focos) se detectaron menos de cinco árboles positivos dispuestos a mayores distancias de la dispersión observada en los huertos L1, M1 y P2. Debido a que estos huertos no fueron censados anteriormente, no fue posible inferir si la fuente de inóculo fue algún vecino positivo previo. La mayor dispersión dentro de las hileras en las huertas L1 y P2 concuerdan con los resultados reportados por Marcus *et al.* (1984) y Gottwald *et al.* (1998), en las cuales las labores de manejo (desmalezado, poda y cosecha) se realizan en dirección de las hileras. En la huerta M1 la dispersión en la diagonal coincide con la dirección de los vientos dominantes. La dispersión en las huertas estudiados esta compuesta por dispersión al vecino más cercano y por una dispersión aleatoria. Esta característica se ha descrita en huertas donde el principal vector es *Aphis gossypii* Glover (Gottwald *et al.*, 1999). La dispersión al vecino más cercano también se ha descrito en otros fitopatógenos transmitidos por vectores, como la clorosis variegada de los cítricos (Laranjeira *et al.*, 2004) y la enfermedad de Pierce en vid (Tubajika *et al.*, 2004).

Cuadro 2.3. Distancias observadas de dispersión de CTV con respecto a los árboles positivos previos más cercanos.

Huerta L1			Huerta M1			
Distancia (m)	Porcentaje		Distancia (m)	Porcentaje		
	Oct-01	Ene-04		Dic-02	Feb-03	Mar-04
d ₁ =8.00	58.2	52.9	d ₁ =6.00	7.2	6.7	10.8
d ₂ =11.31	10.9	5.9	d ₂ =8.00	12.0	6.7	10.8
d ₃ =16.00	3.6	5.9	d ₃ =10.00	10.8	16.7	24.3

$d_4=17.89$	10.9	17.6	$d_4=12.00$	2.4	3.3	6.8
$d_5=22.63$	3.6	0.0	$d_5=14.42$	6.0	6.7	9.5
$d_6=24.00$	3.6	0.0	$d_6=16.00$	14.5	3.3	2.7
$d_7=25.29$	3.6	5.9	$d_7=17.09$	4.8	10.0	8.1
$d_8=28.84$	1.8	5.9	$d_8=18.00$	0.0	1.7	1.4
>32.00	3.6	5.9	≥ 19.70	42.3	44.9	25.6

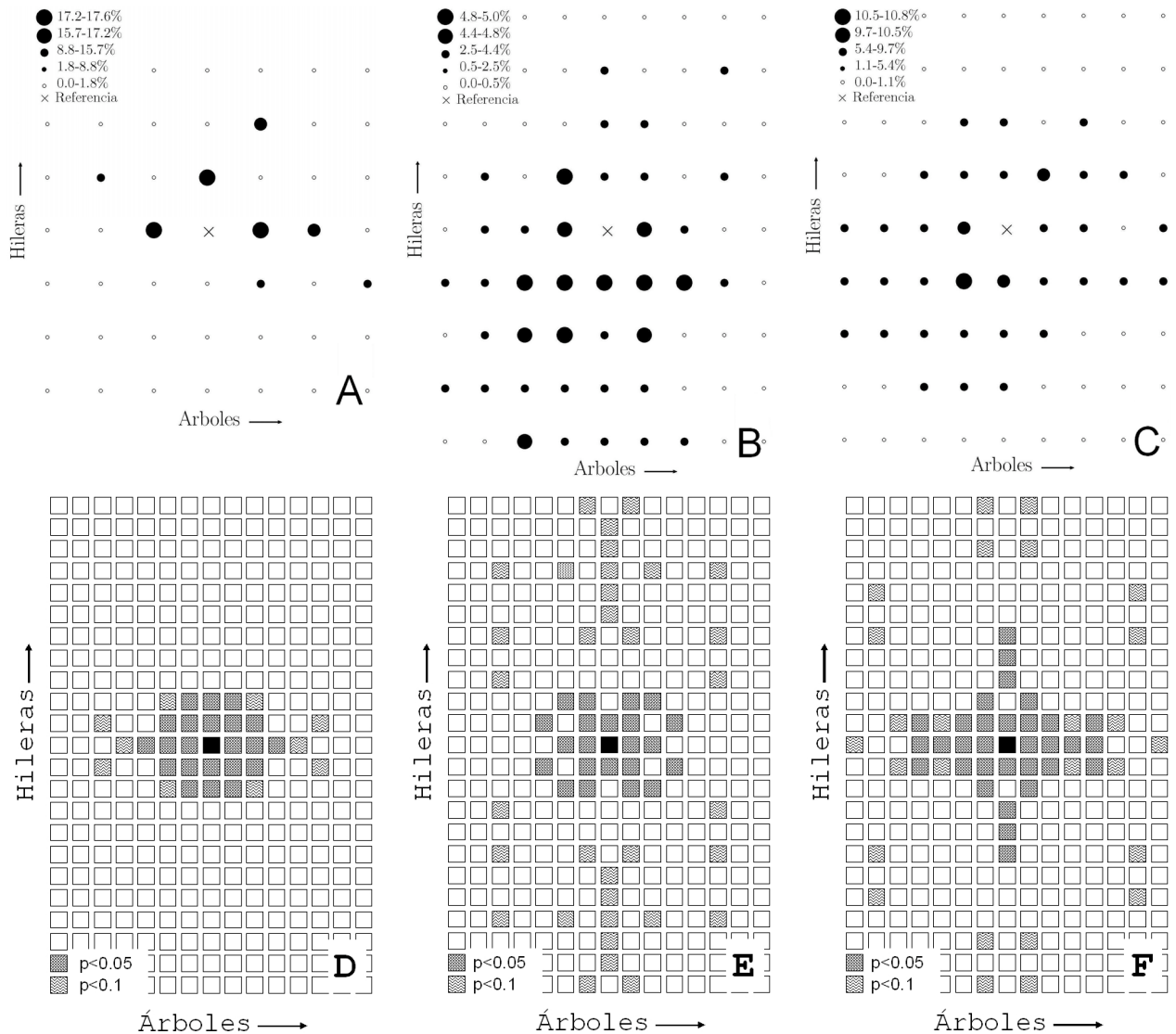


Figura 2.1. Dispersión del CTV a partir del árbol vecino positivo más cercano (A: huerta L1; B, C: huerta M1). Dependencias espaciales continuas (D: huerta L1; E, F: huerta M1).

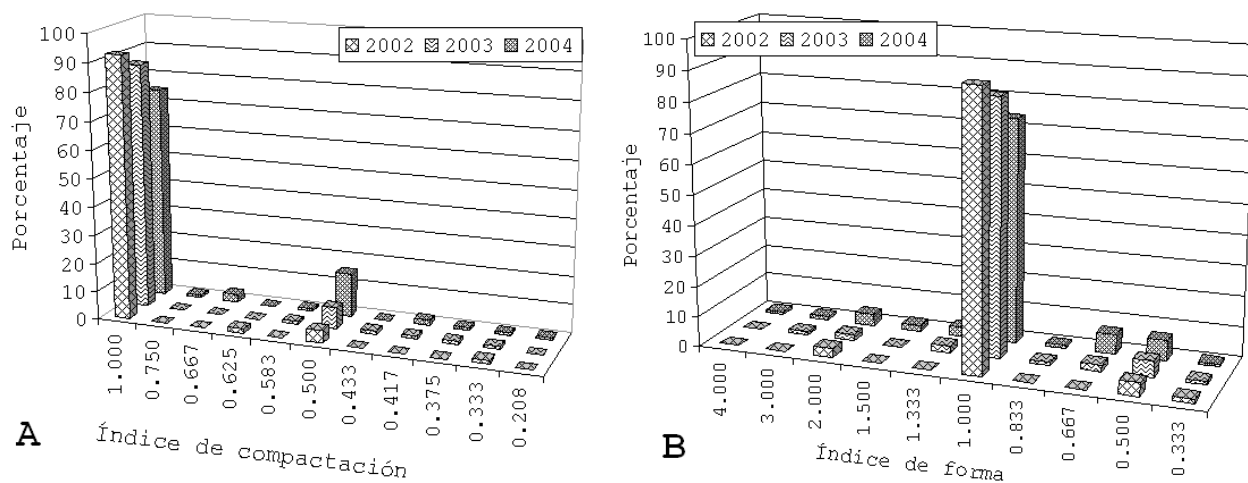


Figura 2.2. Índice de compactación (A) y de forma (B) de la dispersión del CTV en la huerta M1. Tamaulipas, 2004.

Cuadro 2.4. Distancias observadas al árbol vecino positivo más cercano en tres huertas de cítricos muestreados restrictivamente. Tamaulipas, 2004.

Huerta L2		Huerta G1		Huerta G3	
Distancia	Porcentaje	Distancia	Porcentaje	Distancia	Porcentaje
$d_1=8.0$	41.7	$d_1=6.0$	33.3	$d_1=2.0$	31.25
$d_2=11.3$	41.7	$d_2=8.0$	0.00	$d_2=4.0$	25.00
$d_3=16.0$	16.6	$d_3=10.0$	33.3	$d_3=6.0$	6.25
		$d_4=12.0$	33.3	$d_4=6.3$	12.5
				≥ 10.0	25.00

2.4.2. Progreso temporal del *Citrus tristeza virus*

El incremento de la incidencia después de tres años de dispersión en la huerta L1 fue de 0.2 %, de 2.5 % en octubre de 2001 a 2.7 % en enero de 2004. En contraste, en la huerta M1 el incremento anual fue de 3.4 %, de 2.1 % en diciembre de 2002 a 5.5 % en marzo de 2004. La progresión observada en la huerta L1 concuerda con estudios similares realiza-

dos en huertas con naranja dulce en donde el principal vector es *A. gossypii*, la incidencia inicial es menor del 5 % y no se encuentra *T. citricida* (Gottwald *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2001). Aun cuando *A. gossypii* es un vector más eficiente que *A. spiraecola* y *T. aurantii* (Cambra *et al.*, 2000; Marroquín *et al.*, 2004), la menor abundancia del primer vector (Gaona, 1996) podría explicar la baja tasa de dispersión observada en estas huertas. Por el contrario, la huerta M1 con una incidencia actual de 5.5 % y un incremento anual de 3.3 %, concuerda con las condiciones en la cual se podría alcanzar el 95 % de incidencia en 8 a 15 años con los modelos realizados en España y Florida (Gottwald *et al.*, 1997).

2.4.3. Valoración de la erradicación como estrategia de control

Únicamente en la huerta V1 la erradicación del único árbol positivo eliminó al CTV. En la huerta P2, un solo positivo detectado mediante censo en febrero de 2002 y erradicado en mayo de 2003, fue fuente de inóculo para seis plantas contiguas que fueron detectadas en el censo de enero de 2004. En las dos huertas con mayor incidencia de plantas positivas, la erradicación no eliminó al CTV. En la huerta L1 los cuatro positivos detectados en el censo de enero de 2004 fueron vecinos inmediatos (8 y 16 m) de los positivos erradicados en mayo de 2003. En el censo realizado en la huerta M1 en febrero de 2003, un mes después de la erradicación, se detectaron 60 positivos nuevos, de los cuales, 18 son vecinos inmediatos que distan 6, 8 y 10 metros de 11 árboles erradicados. En el censo de marzo de 2004, 25 positivos nuevos fueron vecinos inmediatos (6, 8 y 10 m) de 15 árboles erradicados. El porcentaje de infección después de la erradicación en huertas con baja incidencia inicial (P2, L1, V1) concuerdan con la tasa de infección observada en huertas donde esta medida de control se ha considerado efectiva (Silva *et al.*, 2001; Yokomi y DeBorde, 2005). Sin embargo, en la huerta M1 la tasa de infección observada después la erradicación fue comparable con la tasa de dispersión (1.6-3.3 %) observada en plantaciones en donde no se realizó la erradicación (Yokomi y DeBorde, 2005). En las huertas M1 y L1 hubo aproximadamente un mes entre el último censo y la erradicación, por lo cual la falta de éxito de la erradicación pudo deberse a la falta de oportunidad en el dia-

gnóstico y eliminación de los positivos (Marcus *et al.*, 1989), y/o a la falta de sensibilidad del método de diagnóstico para detectar infecciones iniciales (Ben-Ze'ev *et al.*, 1989). En ambos casos se sugieren censos repetidos de la plantación (Marcus *et al.*, 1989). En fitopatógenos transmitidos por vectores el procedimiento de eliminar árboles vecinos a un positivo erradicado ha sido efectivo en la erradicación de bunchy top disease en plátano (Allen, 1977) y cocoa swollen shoot disease en cacao (Thresh y Owusu, 1986). Este procedimiento se sugiere para la erradicación del CTV, diagnosticando los árboles vecinos (6, 8 y 10 m) un mes después de la erradicación.

2.5. CONCLUSIONES

La dispersión del *Citrus tristeza virus* ocurrió al vecino mas cercano (30.1 y 45.9 % en la huerta M1 y 62.4 % en la huerta L1). Las dependencias espaciales continuas en la huerta L1 fueron de orden 2 hileras y orden 3 árboles, y contuvieron el 82.9 % de la dispersión. En la huerta M1 la dependencia espacial continua fue de orden 1 hileras y orden 4 árboles en la cual ocurrió el 89.4 % de la dispersión. El método de erradicación empleado hasta ahora sólo ha sido efectiva en huertas en donde la incidencia inicial fue menor a 1 %. En huertas con mayor incidencia la erradicación no a sido efectiva, observándose una tasa de hasta 3.5% de nuevas infecciones después de realizada ésta. Por lo cual se recomienda realizar la erradicación apenas detectados árboles positivos. Así mismo, diagnosticar los árboles vecinos dentro, entre hileras y en la diagonal a los candidatos a erradicarse un mes después de realizado ésta.

2.6. AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto recibió apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, No. G35488-B; Fundación Produce-Tamaulipas, A.C.; Comité Estatal para el Fomento de la Citricultura del Estado de Tamaulipas (CFICET) y apoyo logístico del personal de la Campaña contra el CTV del CESAVET, Tamaulipas.

2.7. LITERATURA CITADA

- Allen, R. N. 1977. The spread of bunchy top disease within a banana plantation subject to rouging. New South Wales Department of Agriculture, Biology Branch, Plant Disease Survey 1975-76: 25-25.
- Ben-Ze'ev, I. S., M. Bar-Joseph, Y. Nitzan, and R. Marcus. 1989. A severe citrus tristeza virus isolate causing the collapse of trees of sour orange before virus is detectable throughout the canopy. *Annals of Applied Biology* 114: 293-300.
- Cambra, M., M. T. Gorris, C. Marroquín, M. P. Román, A. Olmos, M. C. Martínez, A. Hermoso de Mendoza, A. López, and L. Navarro. 2000. Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the Valencian community of Spain. *Virus Research* 71: 85-95.
- Fishman, S., R. Marcus, H. Talpaz, M. Bar-Joseph, Y. Oren, R. Salomon, and M. Zohar. 1983. Epidemiological and economic models for spread and control of citrus tristeza virus disease. *Phytoparasitica* 11: 39-49.
- Gaona G., G. 1996. Los pulgones y sus enemigos naturales en tres localidades del centro de Tamaulipas. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Cd. Victoria, Tamaulipas. 80p.
- Garnsey, S. M., and M. Cambra. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens, pp. 193-216. *In*: Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. C. N. Roistacher (Ed.). FAO, Rome.
- Gottwald, T. R., S. M. Richie, and C. L. Campbell. 1992. LCOR2-Spatial correlation analysis software for the personal computer. *Plant Disease* 96: 213-215.
- Gottwald, T. R., S. M. Garnsey, M. Cambra, P. Moreno, M. Irej, and J. Borbon. 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of citrus tristeza virus. *Fruits* 52: 397-404.
- Gottwald, T. R., S. M. Garnsey, and J. Borbón. 1998. Increase and pattern of spread of citrus tristeza virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the

- presence of the brown citrus aphids, *Toxoptera citricidus*. *Phytopathology* 88: 621-636.
- Gottwald, T. R., G. J. Gibson, S. M. Garnsey, and M. Irey. 1999. Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of citrus tristeza virus spread by stochastic modeling. *Phytopathology* 89: 603-608.
- Iracheta C., M. M., M. A. Peña del Río, y M. A. Rocha P. 2005. Comparación de antisueros comerciales para la detección del virus de la tristeza de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 323-328.
- Laranjeira, F. F., A. B. Filho, L. Amorin, and T. R. Gottwald. 2004. Dinâmica especial da clorose variegada dos cítricos em três regiões do estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 29: 56-65.
- Marcus, R., S. Fishman, H. Talpaz, R. Solomon, and M. Bar-Joseph. 1984. On the spatial distribution of the citrus tristeza virus disease. *Phytoparasitica* 12: 45-52.
- Marcus, R., H. Talpaz, and M. Bar-Joseph. 1989. A model for the spread and control of citrus tristeza virus disease. *Journal of Applied Statistics* 16: 315-320.
- Marroquín, C., A. Olmos, M. T. Gorris, E. Bertolini, M. C. Martínez, E. A. Carbonell, A. Hermoso de Mendoza, and M. Cambra. 2004. Estimation of the number of aphids carrying citrus tristeza virus that visit adult citrus trees. *Virus Research* 100: 101-108.
- Nelson, S. C. 1996. A simple analysis of disease foci. *Phytopathology* 86: 332-339.
- Silva V., S., M. A. Peña del Río, R. Peña M., N. Villegas J., K. F. Byerly M., y M. A. Rocha P. 2001. Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *Agrociencia* 35: 441-450.
- Thresh, J. M. and G. K. Owusu. 1986. The control of cocoa swollen shoot disease in Ghana: an evaluation of eradication procedures. *Crop Protection* 5: 41-52.
- Tubajika, K. M., E. L. Civerolo, M. A. Ciomperlik, D. A. Luvisi, and J. M. Hashim. 2004. Analysis of the spatial patterns of Pierce's disease incidence in the lower San Joaquin Valley in California. *Phytopathology* 94: 1136-1144.

Yokomi, R. K., and R. L. DeBorde. 2005. Incidence, transmissibility, and genotype analysis of citrus tristeza virus (CTV) isolates from CTV eradicated and noneradicated districts in central California. *Plant Disease* 89: 859-866.

Capítulo II

DINAMICA ESPACIO-TEMPORAL DE LA DISPERSIÓN DEL CITRUS TRISTEZA VIRUS EN TAMAULIPAS: IMPLICACIONES EN MUESTREO Y ERRADICACIÓN

Noe **Ruiz-García**¹, Gustavo **Mora-Aguilera**¹, Daniel **Ochoa-Martínez**¹, Gustavo **Ramírez-Valverde**²

¹Programa en Fitopatología, ²Estadística. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados;
56230, Montecillo, Estado de México.

Artículo en arbitraje en:

Capítulo III

EFICIENCIA DEL MUESTREO SISTEMÁTICO PARA ESTIMAR LA INCIDENCIA DEL *Citrus tristeza virus* EN PLANTACIONES COMERCIALES DE CITRICOS EN TAMAULIPAS

Noe **Ruiz-García**¹, Gustavo **Mora-Aguilera**¹, Daniel **Ochoa-Martínez**¹, Antonio **Mora-Aguilera**¹, Gustavo **Ramírez-Valverde**², Sami **Jorge-Michreff**³

¹Programa de Fitopatología, ²Estadística. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados; 56230, Montecillo, Estado de México. ³Universidad Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil (morag@colpos.mx).

3.1. RESUMEN

Se compararon varios diseños de muestreo sistemático para estimar la incidencia del virus tristeza de los cítricos empleando poblaciones censadas para comparar diseños de muestreos mediante simulación Monte Carlo, con una incidencia de 2.08 a 5.48 % plantas positivas y con dependencias espaciales continuas de 3 y 1 árbol, dentro y entre de hileras, respectivamente. Los diseños comparados consistieron de una combinación de tamaño de muestra (5, 7.5, 10, 12.5, 15 % de la población) con tamaño y orientación de unidades de muestreo: simétricos (1x1, 2x2, 3x3), entre hileras (2x1, 3x2, 4x3) y dentro de hileras (1x2, 2x3, 3x4). Estos diseños se compararon empleando el sesgo (exactitud) en la estimación de la incidencia y varianza (precisión) del estimador de la incidencia. Para cada diseño se obtuvieron 10000 simulaciones Monte Carlo con inicio aleatorio que proporcionaron los estimadores muestrales de ambos parámetros. El muestreo de unidades simples (árboles individuales) y compuestas con orientación dentro de hileras, acorde con la dispersión del virus mostraron las estimaciones menos sesgadas (< 5 %) con un tamaño de muestra de 5 a 10 %, mientras que con unidades compuestas de 2x1, 2x2 y 3x2 orientados entre hileras se requirieron tamaños de muestra de 12.5 a 15 % para ob-

tener sesgos similares. Incrementar el tamaño de muestra de la población o de las unidades muestrales no reduce el sesgo y tiende a subestimar la varianza del estimador de la incidencia hasta en una tercera parte, para las condiciones de baja prevalencia estudiada.

Palabras clave adicionales: *Citrus tristeza virus*, muestreo espacial, autocorrelacion, DAS-ELISA

3.2. INTRODUCCION

Un sistema de muestreo es un componente fundamental en cualquier sistema de detección y manejo de enfermedades con propósitos de exclusión, erradicación y/o protección de cultivos. Este establece, esencialmente, el tamaño de la muestra y la forma de seleccionar las unidades muestrales de la población con el fin de estimar un atributo de la población (Candy *et al.*, 2003). En el manejo de enfermedades normalmente interesa la cantidad de enfermedad, densidad de esporas e insectos vectores entre otros componentes del sistema epidemiológico. Desde el punto de vista de la exclusión o erradicación, el muestreo tiene como propósito no solo estimar un atributo, sino además identificar las unidades de la población que posee el atributo no deseado para la sanidad del cultivo en un área, región o país. Esta restricción impone la necesidad de incorporar consideraciones espaciales bidimensionales en el sistema de muestreo. Sin embargo, el enfoque numérico clásico para considerar este aspecto ha consistido en aplicar una función de probabilidades que caracterice la disposición espacial del atributo de interés (aleatorio o agregado) para estimar el tamaño de muestra (Hughes *et al.*, 1996). Este enfoque no resuelve el problema específico en relación a la forma de la selección de las unidades muestrales la cual normalmente se efectúa aleatoriamente, incorrecto para aquellas enfermedades con distribución agregada. Otro problema relacionado con la aplicación de los principios de exclusión o erradicación es que el atributo de la población esta a un nivel muy bajo y consecuentemente pocos individuos la poseen. Esto hace prohibitivo la aplicación de las fórmulas clásicas para estimar el tamaño de la muestra que generan valores antieconómicos y no operativos. Por esta razón se ha optado por fijar empíricamente un porcentaje

de la población para fines de muestreo. Para el caso del Citrus tristeza virus se ha fijado en 10 % de la población en California, EUA (Hughes y Gottwald, 1998, 1999) y en México (NOM-031-FITO-2000). Adicionalmente, en el caso de México, la normatividad mexicana establece que con la detección un árbol serológicamente positivo a CTV es necesario realizar un censo poblacional en la unidad de producción respectiva con implicaciones en el costo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el sesgo y la eficiencia de varios diseños sistemáticos con el propósito de identificar los elementos que nos permitan adaptar el muestreo actualmente establecido en la normatividad mexicana, y que incluya la identificación de los árboles positivos con fines de erradicación en las condiciones de Tamaulipas, México.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Huerta de estudio

Se seleccionó una plantación de 4000 árboles (13.4 ha) de 20 años de edad establecida en Mante, en marco real con 8 m entre hileras y 6 m entre árboles. Se realizaron tres censos para la detección serológica de los árboles positivos al virus de la tristeza: en octubre-diciembre de 2002 (incidencia de 2.08 %), febrero de 2003 (incidencia de 3.63 %) y marzo de 2004 (incidencia de 5.48 %).

3.3.2. Caracterización espacial de los mapas de incidencia

Con el fin de establecer el grado y la dirección de la dependencia espacial de las plantas positivas que nos permitan justificar: el subespacio de la parcela a muestrear que denominamos muestreo restringido, y el tamaño y forma de selección de las unidades muestrales, se realizó la caracterización del patrón espacial de la disposición de los árboles positivos. Para este fin se emplearon métodos bidimensionales como la autocorrelación espacial empleando el software LCOR 1.3C (Gottwald *et al.*, 1992) y el índice de forma

de foco (Nelson, 1996). En la autocorrelación espacial se empleó la incidencia de árboles individuales (Gottwald *et al.*, 1998)

3.3.3. Sesgo y eficiencia del muestreo sistemático

Los mapas de las poblaciones censadas se emplearon para evaluar los diseños de muestreo porque se conoce la incidencia verdadera y la ubicación de las plantas positivas. Esta consistió de $N = N_1 \times N_2$ árboles en un arreglo rectangular de $N_1 = n_1 \times k_1$ hileras y $N_2 = n_2 \times k_2$ árboles. Con un intervalo de muestreo de $k_1 = N_1 \bullet n_1^{-1}$ hileras y $k_2 = N_2 \bullet n_2^{-1}$ árboles, una muestra sistemática simple de tamaño $n = n_1 \times n_2$ se obtuvo seleccionando aleatoriamente la hilera $1 < r_1 < k_1$ y el árbol $1 < r_2 < k_2$ de inicio, seleccionando el resto de las hileras mediante $r_1 + (i - 1)k_1$ ($i = 1, \dots, n_1$) y los árboles mediante $r_2 + (j - 1)k_2$ ($j = 1, \dots, n_2$) (Bellhouse y Rao, 1975). Sea x_{ij} el resultado del diagnóstico del j-ésimo árbol ubicado en la i-ésima hilera, con $x_{ij} = 0$ si la planta resulta negativa y $x_{ij} = 1$ si resulta positiva. Un estimador insesgado de la proporción de plantas positivas es $\hat{p} = n^{-1} \sum_{i=1}^{n_1} \sum_{j=1}^{n_2} x_{ij}$ y $V(\hat{p}) = [n^{-1} \hat{p}(1 - \hat{p})]^{1/2}$ (Ridout y Xu, 2000).

Los diseños (D) empleados consistieron en una combinación de tamaño de muestra (5, 7.5, 10, 12.5, 15 % de la población) con tamaño de cuadrantes en tres orientaciones: simétricos (1x1, 2x2, 3x3), entre hileras (2x1, 3x2, 4x3) y dentro de hileras (1x2, 2x3, 3x4). Para cada tamaño de muestra se empleó el mismo intervalo de muestreo entre hileras y entre árboles $k_1 \approx k_2$. Los diseños comparados se evaluaron empleando el sesgo y la eficiencia en la estimación de la incidencia y su varianza empleando dos procedimientos para estimar ambos parámetros. Un primer procedimiento consistió en estimar la incidencia enumerando las $k_1 \times k_2$ muestras simples posibles en cada diseño D , estimando la incidencia con $\bar{\hat{p}}_D = k^{-1} \sum_{j=1}^k \hat{p}_{D,j}$, donde $\hat{p}_{D,j}$ es la incidencia estimada con la j-ésima muestra sistemática simple. El segundo método para estimar la incidencia y su varianza

fue mediante simulación bootstrap (Naranjo y Hutchison, 1997) empleando el generador de números aleatorios Mersenne-Twister (Matsumoto y Nishimura, 1998) para generar 10000 muestras sistemáticas con inicio aleatorio. Este método se programó en Fortran 95. El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. A partir de los mapas de campo se seleccionaron $r = 10000$ muestras sistemáticas simples con inicio aleatorio $\{s_{D,k,ij}^*\}_{i=1,j=1,l=1}^{n_1, n_2, r}$ para cada diseño D evaluado. En cada muestra se estimó la incidencia $\{\hat{p}_{D,l}^*\}_{l=1}^r$ de plantas positivas a CTV.
2. Con las r incidencias anteriores $\{\hat{p}_{D,l}^*\}_{l=1}^r$ se estimó el valor esperado de la incidencia estimada con el diseño D , mediante $\hat{p}_D = E_*[\hat{p}_D^*] = r^{-1} \sum_{l=1}^r \hat{p}_{D,l}^*$.
3. Con las r incidencias anteriores $\{\hat{p}_{D,l}^*\}_{l=1}^r$ se estimó la aproximación montecarlo de la varianza de \hat{p}_D mediante $s_D^2 = (r-1)^{-1} \sum_{l=1}^r (\hat{p}_{D,l}^* - E_*[\hat{p}_D^*])^2$, para cada diseño D .
4. Se estimó el sesgo con respecto a la incidencia real (p) de la incidencia estimada por simulación y por enumeración mediante $B_{sim} = \hat{p}_D - \hat{p}$ y $B_{sys} = \bar{\hat{p}}_D - \hat{p}$, respectivamente.
5. Se estimó la eficiencia del diseño D con respecto al valor verdadero mediante $ef_D = s_D^2 / V(\hat{p})$. El diseño D más eficiente es aquel para el cual $ef_D = 1$, que ocurre cuando la estimación mediante el diseño D es igual a la estimación verdadera, valores mayores a 1 indican un sobrestimación y valores mores de 1 indican una subestimación.
6. Se estimó el porcentaje de cobertura por medio de $CE_D = r^{-1} \sum_i \chi_i$, donde $\chi_i = 1$ si $p_i \in [\hat{p} \pm z_{\alpha/2} V(\hat{p})^{1/2}]$ y $\chi_i = 0$ en caso contrario. Se empleo un intervalo de confianza del 95 % ($z_{\alpha/2} = 1.96$).

3.4. RESULTADOS Y DISCUSION

3.4.1. Caracterización espacial de los mapas de incidencia

En el censo de febrero de 2003 se encontró una dependencia espacial continua de orden 1 hilera (8 m), orden 2 árboles (12 m) y orden 2 (20 m) en la diagonal, conteniendo el 65.1 % de la dispersión. En el censo de 2004 fue de orden 1 hilera (8 m), orden 4 árboles (24 m) y orden 1 (10 m) en dirección diagonal, conteniendo el 89.4 % de la dispersión. El índice de forma de focos indicó que la dispersión ocurre en focos asimétricos de dos hileras y tres árboles (IFF=0.667) y simétricos de dos hileras con dos árboles (IFF=0.5).

3.4.2. Sesgo y eficiencia del muestreo sistemático

Enumerando las $k_1 \times k_2$ muestras sistemáticas simples para cada diseño evaluado, se observa una disminución en el sesgo conforme incrementó la incidencia (Cuadro 3.1, 3.2, 3.3). Con cuadrantes orientados dentro de hileras de tamaño 1x2 y 2x3 sobreestimaron la incidencia con un tamaño de muestra del 5, 7.5 y 10 % de la población, y subestimaron con un tamaño de muestra de 12.5 y 15 % (Cuadro 3.1). Con cuadrantes orientados entre hileras el comportamiento fue contrario, se subestimó la incidencia con cuadrantes pequeños con un tamaño de muestra del 5, 7.5 y 10 %, y se sobreestimó con tamaños de muestra del 12.5 y 15 % (Cuadro 3.3). Con cuadrantes simétricos se subestimó la incidencia, con excepción de cuadrante 2x2 y un tamaño de muestra de 5 %, en la cual la incidencia se estimó insesgadamente (Cuadro 3.2). Con el muestreo de árboles individuales el sesgo fue cíclico, sobrestimaron con el una tamaño de muestra de 5 y 10 %, y subestimaron con un tamaño de muestra de 7.5, 12.5 y 15 % (Cuadro 3.2). La forma de los cuadrantes con sobreestimación coincidió con las dependencias espaciales continuas, de una hilera por dos árboles, dos hileras con dos árboles y dos hileras con tres árboles, respectivamente.

La estimación por simulación también fue sesgada, observándose un sesgo máximo de 2.5 por ciento. El comportamiento fue similar a la estimación obtenida por enumeración de las muestras sistemáticas simples (Cuadro 3.1, 3.2, 3.3). Los menores sesgos se observaron en el muestreo de árboles individuales (Cuadro 3.2). La subestimación de incidencias

en el rango de 0.05 a 0.1 ya se había observado en datos simulados y mapas de campo, empleando cuadrante de dos hileras por dos árboles con un intervalo de muestreo de 10 árboles e hileras contiguas (Hughes y Gottwald, 1998, 1999).

Cuadro 3.1. Sesgo de la incidencia estimada con todas las muestras sistemáticas simples y por simulación con cuadrantes orientados dentro de hileras.

Área	Enumeración			Simulación		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
1x2						
5.0 %	-9.35	-16.99	-7.51	0.29	-0.11	0.08
7.5 %	3.04	6.18	8.15	0.57	0.10	0.25
10.0 %	-7.18	-13.79	-4.88	1.06	0.01	0.43
12.5 %	-17.45	-38.21	-20.58	1.36	-0.09	0.34
15.0 %	-11.66	-18.79	-9.70	2.07	-0.05	0.52
2x3						
5.0 %	2.89	1.30	1.79	0.39	-1.26	0.27
7.5 %	0.39	0.39	1.97	0.03	-1.13	0.39
10.0 %	8.14	4.33	5.95	0.22	-0.63	0.63
12.5 %	-10.75	-20.63	-8.20	-0.29	-1.36	0.60
15.0 %	-9.35	-16.99	-7.51	-0.18	-1.32	0.81
3x4						
5.0 %	-12.14	-7.42	-5.41	-1.26	-1.75	1.84
7.5 %	-12.14	-7.42	-5.41	-1.25	-1.19	1.96
10.0 %	-10.75	-4.22	-2.23	-1.11	-1.38	1.91
12.5 %	-21.35	-8.99	-3.60	-0.80	-1.19	1.91
15.0 %	-19.66	-8.06	-4.11	-0.80	-1.29	2.15

La estimación de la varianza tampoco se obtuvo insesgadamente. En todos los diseños empleados se observó la mayor sobreestimación en tamaños de muestra de 5 y 7.5 % de la población, mientras que tamaños de muestras 10 % o mayores tendieron a subestimar la varianza (Cuadro 3.4, 3.5, 3.6). La sobreestimación de la varianza redujo el porcentaje

de cobertura. Una sobrestimación del triple redujo el porcentaje de cobertura a 50 por ciento. Por el contrario, subestimación de la varianza verdadera incrementó el porcentaje de cobertura. La subestimación en una tercera parte de la varianza verdadera incrementó el porcentaje de cobertura a 95 % o mayores. Eficiencias relativas entre 0.90 y 1.10 tuvieron una cobertura mayores o iguales al 90 por ciento. En el caso del muestreo de árboles individuales, no se afectó la eficiencia de relativa al incrementar el tamaño de la muestra (Cuadro 3.6).

Cuadro 3.2. Sesgo de la incidencia estimada con todas las muestras sistemáticas simples y por simulación con cuadrantes simétricos.

Área	Enumeración			Simulación		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
1x1						
5.0 %	18.65	17.54	18.78	0.13	-0.12	0.02
7.5 %	-9.83	-11.26	0.44	0.75	-0.60	0.06
10.0 %	7.08	6.10	7.71	0.70	-0.46	0.08
12.5 %	-23.76	-56.36	-31.98	0.43	-0.63	0.03
15.0 %	-8.43	-23.12	-8.99	0.61	-0.64	0.10
2x2						
5.0 %	0.00	-1.38	-0.91	0.20	-1.37	0.14
7.5 %	-7.33	-16.50	-4.38	-0.13	-1.56	0.24
10.0 %	-9.35	-16.99	-7.51	-0.11	-1.91	0.17
12.5 %	-13.93	-16.52	-6.68	-0.12	-1.39	0.43
15.0 %	-14.80	-0.19	2.89	-0.07	-2.21	0.44
3x3						
5.0 %	-9.16	-10.59	-5.77	-1.09	-2.00	-0.02
7.5 %	-10.75	-4.22	-2.23	-0.84	-2.02	0.63
10.0 %	-12.10	-6.34	-4.16	-1.21	-1.82	0.68
12.5 %	-23.76	-11.75	-5.90	-1.06	-1.62	1.19
15.0 %	-17.64	-8.06	-1.64	-0.84	-1.83	1.32

Cuadro 3.3. Sesgo de la incidencia estimada con todas las muestras sistemáticas simples y por simulación con cuadrantes orientados entre las hileras.

Área	Enumeración			Simulación		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
2x1						
5.0 %	-9.35	-16.99	-7.51	-0.99	-2.01	-0.03
7.5 %	-16.00	-5.63	-3.87	-0.96	-2.63	-0.18
10.0 %	-7.18	-13.79	-4.88	-1.32	-2.08	-0.26
12.5 %	0.00	-1.38	-0.91	-1.27	-2.26	-0.21
15.0 %	7.08	6.51	5.53	-1.26	-2.57	-0.18
3x2						
5.0 %	-8.72	-4.22	-3.14	-1.19	-2.12	0.17
7.5 %	-10.75	-4.22	-2.23	-1.19	-2.66	-0.01
10.0 %	-17.64	-8.06	-1.64	-1.11	-2.54	0.36
12.5 %	-10.75	-20.63	-8.20	-1.85	-2.32	1.02
15.0 %	-9.35	-16.99	-7.51	-1.75	-2.44	0.97
4x3						
5.0 %	-15.23	-6.34	-5.86	-0.73	-2.38	0.86
7.5 %	-12.14	-7.42	-5.41	-1.04	-2.41	0.80
10.0 %	-7.42	0.58	2.26	-0.88	-2.93	1.15
12.5 %	2.89	1.30	1.79	-0.82	-2.61	1.29
15.0 %	0.39	0.39	1.97	-0.86	-2.59	1.66

Es bien conocido que la estimación de cualquier parámetro depende fuertemente del tamaño y forma de las unidades muestrales (Cochran, 1977). Además del empalme entre dos procesos diferentes: la disposición de los árboles positivos en el campo y arreglo geométrico de las unidades muestrales seleccionadas (Ferrandino, 2004). De los resultados mostrados en los cuadros anteriores es claro que la estimación de la incidencia dependió de los dos factores que afectan la estimación de un parámetro mediante un proceso de muestreo. Cuadrantes del mismo tamaño pero de forma diferente produjeron estimacio-

nes diferentes (Cuadro 3.1 y 3.3). Lo mismo ocurrió con los cuadrantes de forma simétrica (Cuadro 3.2). Este efecto también se ha observado en la estimación de la densidad media del hongo *Verticillium dahliae* y el nematodo *Pratylenchus* spp, en la cual se substituyó la media y varianza con cuadrantes grandes (Wheeler *et al.*, 2000).

Cuadro 3.4. Eficiencia de la estimación de la varianza y porcentaje de cobertura en la estimación de la media con cuadrantes orientados dentro de hileras.

Área 1x2	Eficiencia			Porcentaje de cobertura		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
5.0 %	1.35	1.29	1.26	88.7	91.1	90.9
7.5 %	1.05	1.12	1.05	93.3	87.3	90.0
10.0 %	0.77	0.67	0.64	87.7	92.1	91.3
12.5 %	0.63	0.74	0.82	87.7	83.9	82.1
15.0 %	0.54	0.39	0.47	88.9	94.2	89.5
2x3						
5.0 %	1.46	1.33	1.05	87.2	91.1	94.0
7.5 %	0.90	0.90	0.81	92.4	92.0	91.2
10.0 %	0.80	0.70	0.67	90.9	91.4	90.7
12.5 %	0.38	0.45	0.55	93.9	93.1	88.6
15.0 %	0.35	0.40	0.46	95.8	92.4	87.2
3x4						
5.0 %	1.64	3.06	2.59	88.7	64.3	70.6
7.5 %	1.32	2.68	2.20	82.3	53.3	61.6
10.0 %	0.69	0.62	0.51	91.7	92.8	94.6
12.5 %	0.54	0.37	0.34	93.5	94.9	96.8
15.0 %	0.43	0.36	0.41	92.6	94.4	92.5

Por otra parte, la estimación también dependió de la concordancia entre el proceso que determina la disposición espacial de los árboles positivos y el acomodo geométrico de las unidades muestreadas. Cuando ambos procesos coincidieron, se observó menos sesgo en

la estimación con el muestreo del 5 y 7.5 % de la población (Cuadro 3.1, 3.2). Cuando ambos procesos fueron contrarios, se requirió mayores tamaños de muestra de 12.5 y 15 % para observar el mismo sesgo. Un comportamiento similar se observó en la estimación de la densidad media del nematodo *Globodera* spp en cuadrantes igualmente espaciados entre hileras y dentro de las hileras, en la cual se mejoró el error en la estimación al alargar los cuadrantes en dirección de las hileras, que corresponde con la dispersión del nematodo (Been y Schomake, 2000).

Cuadro 3.5. Eficiencia de la estimación de la varianza y porcentaje de cobertura en la estimación de la media con cuadrantes simétricos.

Área	Eficiencia			Porcentaje de cobertura		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
1x1						
5.0 %	1.30	1.14	1.07	93.5	95.5	93.4
7.5 %	0.87	0.82	0.84	89.8	88.2	90.5
10.0 %	0.59	0.77	0.33	89.6	93.5	100.0
12.5 %	0.90	1.39	1.66	83.3	66.4	66.4
15.0 %	0.64	0.85	0.91	82.8	75.7	76.3
2x2						
5.0 %	1.18	1.19	1.11	93.7	90.9	95.1
7.5 %	0.70	0.89	0.84	95.1	91.4	90.6
10.0 %	0.45	0.51	0.58	96.1	94.1	92.8
12.5 %	0.41	0.61	0.47	93.3	90.8	93.4
15.0 %	0.55	0.60	0.62	90.2	85.7	83.3
3x3						
5.0 %	1.87	3.55	3.18	85.3	70.5	68.6
7.5 %	0.85	0.80	0.69	91.8	92.3	93.8
10.0 %	0.74	0.64	0.82	91.3	92.3	87.9
12.5 %	0.55	1.15	0.63	89.8	92.8	87.8
15.0 %	0.39	1.01	0.36	93.6	92.3	93.7

Cuadro 3.6. Eficiencia de la estimación de la varianza y cuadrado porcentaje de cobertura en la estimación de la media con cuadrantes orientados entre hileras.

Área	Eficiencia			Porcentaje de cobertura		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
2x1						
5.0 %	0.96	0.90	1.04	94.2	97.3	95.5
7.5 %	0.97	0.96	0.83	89.7	91.9	94.7
10.0 %	0.67	0.58	0.50	91.2	93.8	96.7
12.5 %	0.49	0.76	0.92	92.5	84.1	80.0
15.0 %	0.40	0.66	0.73	95.6	82.3	80.4
3x2						
5.0 %	1.63	3.15	2.85	91.3	71.8	67.7
7.5 %	0.95	0.83	1.09	89.8	92.5	87.5
10.0 %	0.52	0.46	0.48	96.0	96.4	94.9
12.5 %	0.36	0.50	0.49	95.8	93.8	90.9
15.0 %	0.27	0.31	0.40	98.1	95.3	92.1
4x3						
5.0 %	1.79	2.94	2.57	88.5	68.6	71.7
7.5 %	1.19	2.51	2.09	83.8	57.2	65.2
10.0 %	0.54	0.50	0.49	96.3	94.7	94.6
12.5 %	0.50	0.35	0.34	93.9	97.2	96.5
15.0 %	0.39	0.38	0.40	94.6	93.9	93.5

El menor sesgo observado en el muestreo de árboles individuales, así como la falta de tendencia en el sesgo y la eficiencia relativa, sugiere que el muestreo de árboles individuales es menos afectado por el patrón espacial en la disposición de los árboles positivos que el muestreo en cuadrantes. Este comportamiento sugiere que, en una situación desconocida, es necesario tomar en cuenta los mecanismos que determinen la dispersión del virus: dirección de las hileras, de los vientos dominantes y labores de manejo del huerto. Por el contrario, cuando se tiene información sobre el patrón espacial de la disposición

de los árboles positivos, el muestreo por cuadrantes ubicados en dirección de estas dependencias podría ser el diseño recomendado.

3.5. CONCLUSIONES

El sesgo en la estimación de la incidencia de plantas positivas disminuyó conforme se incrementó el tamaño de muestra de la población. En el caso de unidades muestrales orientados dentro de hileras (1x2 y 2x3) el sesgo en la estimación de la incidencia fue menor con tamaños de muestra de 5, 7.5 y 10 % de la población. Por el contrario, con unidades muestrales simétricos y orientados entre hileras el comportamiento fue contrario, las menor subestimación ($< 5\%$) se observó con tamaños de muestras de 12.5 y 15 % de la población. En todos los diseños comparados, se observó una subestimación de la varianza conforme incrementó el tamaño de muestra de la población y el tamaño de las unidades muestrales (3x3, 3x4 y 4x3). La subestimación incrementó el porcentaje de cobertura (precisión) en la media verdadera hasta un 95 por ciento, al reducir la varianza del estimador de la incidencia. El muestreo de árboles individuales fue el diseño menos afectado en el sesgo de la estimación de la incidencia y la varianza, con tamaños de muestra de 5 a 15 % de la población. En una situación donde no se conocen las dependencias espaciales, el muestreo de árboles individuales o cuadrantes pequeños orientados en dirección de la dispersión con un tamaño de muestra de 5 a 10 % podría proporcionar la estimación menos sesgada de la incidencia de virus en una huerta.

3.6. LITERATURA CITADA

- Been, T. H., C. H. Schomaker. 2000. Development and evaluation of sampling methods for fields with infestation foci of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*). *Phytopathology* 90: 647-656.
- Bellhouse, D. R. 1977. Some optimal designs for sampling in two dimensions. *Biometrika* 64: 605-611.

- Candy, S. G. 2002. Empirical binomial sampling plans: model calibration and testing using William's method III generalized linear models with overdispersion. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 7: 373-388.
- Cochran, W. G. 1977. *Sampling techniques*. John Wiley Sons. New York. 428p.
- Ferrandino, F. J. 2004. Measuring spatial aggregation in binary epidemics: correlative analysis and the advantage of fractal-based sampling. *Phytopathology* 94: 1215-1227.
- Gottwald, T. R.; Richie, S. M.; Campbell, C.L. 1992. LCOR2-Spatial correlation analysis software for the personal computer. *Plant Disease* 96: 213-215.
- Gottwald, T. R., S. M. Garnsey, and J. Borbón. 1998. Increase and pattern of spread of citrus tristeza virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphids, *Toxoptera citricidus*. *Phytopathology* 88: 621-636.
- Hughes, G., L. V. Madden, and G. P. Munkvold. 1996. Cluster sampling for disease incidence data. *Phytopathology* 83: 132-137.
- Hughes, G., and Gottwald, T. R. 1998. Survey methods for assessment of Citrus Tristeza Virus incidence. *Phytopathology* 88: 87-723.
- Hughes, G., and Gottwald, T. R. 1999. Survey methods for assessment of Citrus Tristeza Virus incidence when *Toxoptera citricida* is the predominant vector. *Phytopathology* 88: 87-723.
- Matsumoto, M., and T. Nishimura. 1998. Mersenne twister: a 623-dimensionally equidistributed uniform pseudo-random number generator. *ACM Transactions on Modeling and Computer Simulation* 8: 3-30.
- Naranjo, S. E., W. D. Hutchison. 1997. Validation of arthropod sampling plans using resampling approach: software and analysis. *American Entomologist* 43: 48-57.
- Nelson, S. C. 1996. A simple analysis of disease foci. *Phytopathology* 86: 332-339.
- Ridout, M. S., and X. M. Xu. 2000. Relationships between several quadrant based statistical measures used to characterize spatial aspects of disease incidence data. *Phytopathology* 90: 568-575.

- Wheeler, T. A., Madden, L. V., Rowe, R. C., and Riedel, R. M. 2000. Effects of quadrat size and time of year for sampling of *Verticillium dahliae* and lesion nematodes in potato fields. *Plant Disease* 84: 961-966.
- Wolter, K. M. 1984. An investigation of some estimators of variance for systemic sampling. *Journal of the American Statistical Association* 79: 781-790.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

CONCLUSIONES

En la normatividad oficial mexicana (NOM-031-FITO-2000) se establece la erradicación de plantas positivas al CTV detectadas por DAS-ELISA como un componente en el manejo del *Citrus tristeza virus*, además del empleo de patrones tolerantes, monitoreo y control de sus vectores. Las experiencias oficiales en México muestran que, aunque las acciones de erradicación en viveros aparentemente impidieron su establecimiento regional, ésta no impidió su dispersión a otros estados productores de cítricos. Esto se ha debido, además del costo, a la dificultad inherente a una enfermedad de baja prevalencia, lo que dificulta el desarrollo de criterios efectivos de detección y el estudio de mecanismos de dispersión que sustenten el muestreo y el proceso de erradicación. Para obtener información epidemiológica para las condiciones de México que nos permitan ofrecer propuestas viables acerca de un método económico, confiable y oportuno en el diagnóstico del virus, así como las tasas de dispersión y su influencia en las estrategias de muestreo del mismo, se monitoreo la dispersión del CTV en 11 huertos comerciales de cítricos durante el período de diciembre de 2001 a marzo de 2004, empleando dos métodos serológicos con el mismo principio antigénico para el diagnóstico, innoimpresión-ELISA y DAS-ELISA. Los resultados obtenidos nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La comparación de innoimpresión-ELISA con respecto al método oficial de diagnóstico DAS-ELISA, en una población de 157 árboles positivos y 3200 árboles negativos conocidos con infecciones recientes, así como 4054 árboles de infección desconocida, mostró que el método serológico de innoimpresión-ELISA fue más confiable que DAS-ELISA en un escenario de árboles con infección reciente o desconocida, empleando 10 brotes jóvenes por árbol y realizando una impresión simple por pecíolo. En ambos escenarios, las muestras discordantes fueron árboles con

dos o menos brotes positivos, por lo cual, el mejor desempeño de inmunopresión-ELISA se debió a un posible efecto de dilución en el procesamiento del tejido vegetal. Agrupando las muestras por edad de los brotes, ninguna de las dos técnicas fue afectada por esta característica sugiriendo que el virus invade rápidamente los mismos, pero si fueron afectados por la edad de la infección, posiblemente por la pérdida de titulación conforme incrementa el tiempo desde la infección inicial. Inmunopresión-ELISA fue más oportuno que DAS-ELISA en los diagnósticos, requiriendo una sexta parte de tiempo empleado por DAS-ELISA, principalmente por el tiempo requerido para el procesamiento del tejido vegetal. Por esta última característica inmunopresión-ELISA fue 57.5 % más económica que DAS-ELISA.

2. El seguimiento por censo de cuatro huertas con dos condiciones iniciales de incidencia de árboles positivos: baja (< 1 %) y alta (2.08-5.48 %), durante 4 años permitió determinar las tasas de dispersión temporal y espacial del virus tristeza. La tasa de dispersión anual del virus tristeza fue de 0.2 % en huertas de baja incidencia y de 3.4 % en huertas con alta incidencia. En las huertas de alta incidencia, el 82.9 % de esta dispersión ocurrió en el área que comprende 2 hileras (16 m) y 3 árboles (18 m) en las huertas. La mayor dispersión dentro de la hilera que entre hileras pudo deberse a que las labores de manejo se realizan en esta dirección. Otro efecto de la dispersión se observó en la falta de eficacia de la erradicación de plantas positivas como estrategia de manejo del virus tristeza. En huertas con alta incidencia, después de la erradicación se observó una tasa de dispersión de hasta 3.3 % después de realizado ésta, de los cuales 1.1 % fueron árboles positivos que fueron vecinos inmediatos (6, 8 y 10 m) de árboles erradicados.
3. Los diseños de muestreo sistemáticos comparados consistentes de una combinación de tamaño de muestra con tamaño y forma de unidades muestrales, mostró que cuando las unidades muestrales estuvieron orientados dentro de las hileras (1x2, 2x3), tuvieron un sesgo menor de 5 % en la estimación de la incidencia con

tamaños de muestra del 5 a 10 % del total poblacional. Este comportamiento también se observó con el muestreo de árboles individuales. Por el contrario, con unidades muestrales simétricos y orientados entre hileras (2x2, 3x2), se requirió un tamaño de muestra de 12.5 a 15 % para obtener sesgos similares en la estimación de la incidencia. El menor sesgo se observó cuando la orientación de las unidades muestrales (1x1, 1x2, 2x3) coincidió con la dirección de la dispersión. Incrementar el tamaño de las unidades muestrales (3x3, 3x4, 4x3) no redujo el sesgo en la estimación de la incidencia. Esto se debió posiblemente al hecho de que unidades muestrales mayores a las dependencias espaciales tienen menor correlación entre las unidades muestrales. En todos los diseños comparados, se observó una subestimación de la varianza conforme incrementó el tamaño de muestral. Por esta subestimación se incrementó y el menor sesgo en la estimación de la incidencia, tuvo el efecto de incrementar la precisión hasta un 95 % en la estimación de la incidencia verdadera de plantas positivas.

RECOMENDACIONES

El método de inmunopresión-ELISA se recomienda como un método oportuno, confiable y económico para el diagnóstico del virus tristeza en muestreos extensivos de campo para. Sin embargo, por las especificaciones de la norma oficial mexicana NOM-031-FITO-2000, estas muestras deben ser verificados posteriormente por el método oficial de diagnóstico, DAS-ELISA. Este procedimiento representa un ahorro total del 54.9 % y sigue siendo oportuna, pues únicamente se verificarían las muestras positivas. Adicionalmente, se recomienda la erradicación de los árboles positivos apenas identificados estos, y diagnosticar los árboles vecinos que disten 6, 8 y 10 metros del árbol erradicado, un mes después de la erradicación. Puesto que estos árboles pueden estar infectados y no ser detectados por el método de diagnóstico por el reducido número de varetas positivas y heterogeneidad en su disposición alrededor del dosel del árbol que caracterizan a las infecciones iniciales. En el diseño de esquemas de muestreo para identificar los árboles positivos en una situación desconocida, es necesario tomar en cuenta los mecanismos que determinen la dispersión del virus: dirección de las hileras, de los vientos dominantes y labores de manejo del huerto. En este caso se recomienda el muestreo de árboles individuales. Por el contrario, cuando se cuenta con información sobre en patrón espacial de la disposición de los árboles positivos en una huerta, el muestreo unidades muestrales compuestas orientadas hacia las dependencias espaciales podría ser el diseño recomendado.

APÉNDICE A

A.1. Descripción de las huertas donde se colectaron los tejidos

El trabajo se realizó en 11 huertos comerciales durante el período de diciembre de 2001 a marzo de 2004. La selección de huertas se realizó previa confirmación serológica con la técnica DAS-ELISA de al menos un árbol positivo al CTV, obtenido con un muestreo sistemático en zig-zag del 10 % de la huerta por la Campaña contra el CTV operada por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal (CESAVET).

Cuadro A.1. Características de las huertas por antecedente de infección en donde se colectaron los tejidos empleados en la comparación de inmunopresión-ELISA con respecto a DAS-ELISA en la detección del CTV. Tamaulipas, 2004.

Escenario	Huerta	Variedad	Edad	Muestras	Fecha	Diagnósticos anteriores
a) Conocido						
	G1	Valencia	20	8	09-03	02-02, 10-02
	G2	Valencia	12	10	08-03	09-02, 01-03
	L1	Valencia	40	58	04-03	12-01, 03-02, 09-02
	M1	Valencia	20	62	01-04	12-02, 02-03
	P1	Val. Temprana	13	19	09-03	11-02
b) Reciente						
	G2	Valencia	12	413	01-04	09-02, 01-03
	L1	Valencia	40	384	01-04	12-01, 03-02, 09-02, 04-03
	M1	Valencia	20	1962	03-04	12-02, 02-03
	P2	Marrs	12	441	03-04	01-03
c) Desconocido						
	G1	Valencia	20	384	01-04	02-02
	G3	Mandarina	10	390	03-04	
	L2	Val. Temprana	15	427	03-04	
	L3	Navel	14	433	03-04	
	P1	Val. Temprana	13	1596	01-04	11-02
	P3	Valencia	20	384	03-04	
	V1	Valencia	16	440	01-04	

Las muestras se clasificaron de acuerdo con su historial con respecto a la infección por CTV (Cuadro A.1). Positivos históricos. Esta población consistió de 157 árboles positivos identificados previamente empleando DAS-ELISA en la campaña contra el CTV en

2001-2002 y 2002-2003, fecha a partir del cual se le dió seguimiento con DAS-ELISA. Los árboles de esta población tuvieron un tiempo de infección de dos años o más. Negativos históricos. Una población de 3200 árboles que fueron declarados negativos con DAS-ELISA en por lo menos dos censos, con excepción de la huerta P1. Los árboles positivos detectados en esta población se debieron a infecciones recientes no detectadas durante los censos previos y/o la dispersión entre huertas. Estos árboles tuvieron cuando mas un año de infección. Árboles de infección desconocida. Se consideraron 4054 árboles ubicados en el área de influencia de nueve hileras por 49 árboles de un positivo conocido (Loeza, 2003). La incidencia y la fecha de detección solo se conocieron en el árbol de referencia, por lo cual las muestras en esta población se consideraron de incidencia desconocida.

En el análisis con inmunopresión-ELISA se emplearon los pecíolos de las hojas y la corteza de los brotes para el análisis con DAS-ELISA. Ambos análisis serológicos se realizaron independientemente. Los resultados se muestran en el Cuadro A.2.

Cuadro A.2. Comparación de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en la detección de árboles positivos al CTV en tres antecedentes de infección. Tamaulipas, 2004.

		a) Conocido			b) Reciente			c) Desconocido		
		DAS-ELISA			DAS-ELISA			DAS-ELISA		
		+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total
Inmunopresión	+	149	4	153	78	6	84	45	4	49
	-	3	1	4	0	3116	3116	1	4004	4005
	Total	152	5	157	78	3122	3200	46	4008	4054

A.2. Estimación de la sensibilidad, índices predictivos y concordancia

Para estimar los índices epidemiológicos empleados en la comparación de los métodos de diagnóstico se escribió un programa en el ambiente de análisis estadístico R¹, que muestra en el Listado A.1. Con los resultados de la comparación de ambos métodos de dia-

¹R Development Core Team (2007). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

gnóstico en el antecedente infección de positivos históricos (Cuadro A.2), empleando el programa desarrollado se obtienen los estimadores y su intervalo de confianza respectivo mostrados en el Cuadro A.3.

Cuadro A.3. Valores estimados de los parámetros epidemiológicos para medir el desempeño de un método nuevo de diagnóstico con respecto a una prueba de diagnóstico estándar.

Parámetros epidemiológicos para comparar dos métodos de diagnóstico

	Intervalo de confianza del 95%				
	Aprox. Normal		Exacto Binomial		
	Proporción	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Sensibilidad	98.026	95.815	100.238	94.341	99.591
IPP	97.386	94.857	99.914	93.442	99.283
Exactitud	95.541	75.315	115.768	19.412	99.369

Listado A.1. Función que permite estimar la sensibilidad, índice predictivo de positivos y concordancia de dos técnicas de diagnóstico con árboles de infección conocida.

```

senspe <- function (a, b, c, d)
# a: Positivos por ambos metodos
# b: Positivos por inmunopresion-ELISA y negativos por DAS-ELISA
# c: Negativos por inmunopresion-ELISA y positivos por DAS-ELISA
# d: Negativos por ambos metodos
{
  phat <- matrix(0, nrow=5, ncol=5)

  # percentiles para el intervalo de confianza
  lpct <- 0.025
  upct <- 0.975

  # Sensibilidad
  rate <- a/(a+c)
  phat[1,1] <- rate*100

  # Aproximacion normal del intervalo de confianza
  # Limite inferior
  phat[1,2] <- (rate+qnorm(lpct)*sqrt(rate*(1-rate)/(a+c)))*100
  # Limite superior
  phat[1,3] <- (rate+qnorm(upct)*sqrt(rate*(1-rate)/(a+c)))*100

  # Intervalo de confianza exacto basado en la distribucion binomial
  # Limite inferior
  if (a > 0) {
    phat[1,4] <- (1 - qbeta(upct,c+1,a))*100
  } else {
    phat[1,4] <- 0
  }
}

```

```

}
# Limite superior
if (a < (a+c)) {
  phat[1,5] <- (1 - qbeta(lpct,c,a+1))*100
} else {
  phat[1,5] <- 1*100
}

# Indice predictivo de positivos
rate <- a/(a+b)
phat[3,1] <- rate*100

# Aproximacion normal del intervalo de confianza
# Limite inferior
phat[3,2] <- (rate+qnorm(lpct)*sqrt(rate*(1-rate)/(a+b)))*100
# Limite superior
phat[3,3] <- (rate+qnorm(upct)*sqrt(rate*(1-rate)/(a+b)))*100

# Intervalo de confianza exacto basado en la distribucion binomial
# Limite inferior
if (a > 0 ) {
  phat[3,4] <- (1 - qbeta(upct,b+1,a))*100
} else {
  phat[3,4] <- 0
}
# Limite superior
if (a < (a+b)) {
  phat[3,5] <- (1 - qbeta(lpct,b,a+1))*100
} else {
  phat[3,5] <- 1*100
}

# Exactitud
rate <- (a+d)/(a+b+c+d)
phat[5,1] <- rate*100

# Aproximacion normal del intervalo de confianza
# Limite inferior
phat[5,2] <- (rate+qnorm(lpct)*sqrt(rate*(1-rate)/(c+d)))*100
# Limite superior
phat[5,3] <- (rate+qnorm(upct)*sqrt(rate*(1-rate)/(c+d)))*100

# Intervalo de confianza exacto basado en la distribucion binomial
# Limite inferior
if (d > 0) {
  phat[5,4] <- (1 - qbeta(upct,d+1,c))*100
} else {
  phat[5,4] <- 0
}
# Limite superior
if (d < (c+d)) {
  phat[5,5] <- (1 - qbeta(lpct,d,c+1))*100
} else {
  phat[5,5] <- 1*100
}

colnames(phat) <- c("Proporción","Inferior","Superior","Inferior","Superior")
rownames(phat) <- c("Sensibilidad","Especificidad","IPP","IPN","Exactitud")

cat("\n Parámetros epidemiológicos para comparar dos métodos de diagnostico")
cat("
Intervalo de confianza del 95% \n")

```

```

cat("                Aprox. Normal      Exacto Binomial  \n")
cat("                -----  -----  \n")
phat <- round(phat, digits = 3)
print (phat, justify=c("right"))
cat("-----\n")
}

```

A.3. Estimación de la incidencia aplicando dos métodos de diagnóstico en muestras de infección desconocida

El programa mostrado en el Listado A.2 permite estimar la sensibilidad en la comparación de dos métodos de diagnóstico aplicados simultáneamente en muestras de infección desconocida. En el Cuadro A.4 se muestran los resultados obtenidos aplicando el programa con las concordancias mostrados en el Cuadro A.2.

Cuadro A.4. Frecuencias observadas y probabilidades de detección en la validación de inmunopresión-ELISA con respecto a DAS-ELISA como método de referencia, en la detección del virus de la tristeza de los cítricos. Tamaulipas, 2004.

		Escenario de infección	
		Desconocido	Reciente
Método de detección			
	DAS-ELISA	46	78
	Inmunopresión-ELISA	49	84
	Ambos	45	78
	Total	4008	3200
Sensibilidad estimada			
	$\hat{p}_{\text{DAS-ELISA}} \pm es(\hat{p}_{\text{DAS-ELISA}})$	0.918±0.004	0.929±0.005
	$\hat{p}_{\text{Inmunopresión-ELISA}} \pm es(\hat{p}_{\text{Inmunopresión-ELISA}})$	0.978±0.002	1.000±0.000
	$\hat{p} \pm es(\hat{p})$	0.998±0.001	1.000±0.000
Razón estimada de falsos negativos			
	$\hat{\theta} \pm es(\hat{\theta})$	0.002±0.001	0.000±0.000

Listado A.2. Función para estimar la sensibilidad y su intervalo de confianza en la comparación de dos técnicas de diagnóstico con árboles de infección desconocida.

```

twoscreen <- function (b, d1, d2, n)
# b : Positivos por ambos métodos
# d1: Positivos por inmunopresion-ELISA
# d2: Positivos por DAS-ELISA
# n : Numero total de muestras analizadas
{
  # Estimando sensibilidad para el metodo de diagnostico 1
  if (d2 != 0.0) {
    p1 <- b / d2
  } else {
    if (d1 > 0.0) {
      p1 <- 1.0
    } else if (d1 == 0.0) {
      p1 <- 0.0
    }
  }
}

# Estimando sensibilidad para el metodo de diagnostico 2
if (d1 != 0.0) {
  p2 <- b / d1
} else {
  if (d2 > 0.0) {
    p2 <- 1.0
  } else if (d2 == 0.0) {
    p2 <- 0.0
  }
}

# Estimando varianzas para los estimadores
sdp1 <- sqrt( (p1*(1.0 - p1) / p2) / n )
sdp2 <- sqrt( (p2*(1.0 - p2) / p1) / n )

# Estimando la varianza comun
np <- p1 + p2 - p1*p2;
sdnp <- sqrt( (np*(1.0-np)*(p1 + p2)) / ( n*p1*p2 ) )

# Razon estimada de falsos negativos con dos programas de diagnostico
th = 1.0 - np;

cat("\n Razon estimada de falsos negativos con dos metodos de dignostico \n")
cat(" Frecuencias observadas: \n")
cat(" DAS-ELISA = ", d1, "\n")
cat(" Inmuno = ", d2, "\n")
cat(" Ambos = ", b, "\n")
cat(" Sensivilidad estimada:\n" )
cat(" DAS-ELISA = ", p1 , "\n")
cat(" SE(DAS) = ", sdp1, "\n")
cat(" Inmuno = ", p2 , "\n")
cat(" SE(Inmuno) = ", sdp2, "\n")
cat(" p = ", np , "\n" )
cat(" se(p) = ", sdnp, "\n")
cat(" Prop. estimada de falsos negativos:\n")
cat(" theta = ", th , "\n")
cat(" se(theta) = ", sdnp, "\n")
}

```

A.4. Estimación del índice de concordancia kappa

La concordancia entre dos métodos de diagnóstico aplicados simultáneamente a una población de infección desconocida puede estimarse con el programa en el Listado A.3. En el Cuadro A.5 se muestra los resultados aplicando el programa a las concordancias observadas en el escenario de positivos históricos e infección desconocida mostrado en el Cuadro A.2.

Cuadro A.5. Estimación del índice de concordancia kappa entre dos métodos de diagnóstico del CTV en dos antecedentes de infección. Tamaulipas, 2004.

a) Árboles positivos históricos	b) Árboles de infección desconocida
kappa : 0.96200	kappa : 0.94675
es(kappa) : 0.01766	es(kappa) : 0.01570
z : 54.45841	z : 60.31103
valor-p : 0.00000	valor-p : 0.00000

Listado A.3. Función que permite estimar la concordancia entre dos métodos de diagnóstico aplicados simultáneamente a una muestra de infección desconocida.

```
kappa2 <- function (a, b, c, d)
# a: Positivos por ambos metodos
# b: Positivos por inmunopresion-ELISA y negativos por DAS-ELISA
# c: Negativos por inmunopresion-ELISA y positivos por DAS-ELISA
# d: Negativos por ambos metodos
{
  ttab <- matrix(0, nrow = 2, ncol = 2)

  ttab[1,1] <- d
  ttab[1,2] <- c
  ttab[2,1] <- b
  ttab[2,2] <- a

  # Obtiene las proporciones observadas
  pij <- ttab/(n <- sum(ttab))

  # Totales por cada metodo de diagnostico
  row.sums <- rowSums(pij)
  col.sums <- colSums(pij)
  outer.sum <- outer(row.sums, col.sums, "+")

  # Valores observados y esperados para cada metodo
  pio <- sum(diag.pij <- diag(pij))
  pie <- sum(row.sums*col.sums)
```

```

# Índice kappa de asociacion
value <- (pio-pie)/(1-pie)

# Se obtiene la varianza asintotica
kappase <- 1/((1 - pie) * sqrt(n)) * sqrt(pie +
      pie^2 - sum(row.sums * col.sums * (row.sums + col.sums)))

u <- value/kappase
p.value <- 2*(1 - pnorm(abs(u)))

cat("\n Índice de concordancia kappa entre 2 métodos de diagnostico \n")
cat("      Kappa",value, "\n")
cat(" se(kappa)",kappase, "\n")
cat("      z",u, "\n")
cat("      p.value",p.value, "\n")
}

```

A.5. Descripción de la técnica de Inmunoimpresión-ELISA

El método de inmunoimpresión-ELISA para la detección del virus de la tristeza de los cítricos fue dado a conocer en 1993 (Garnsey *et al.*, 1993). Consiste en emplear membranas de nitrocelulosa para capturar e inmovilizar la savia del tejido vegetal con las partículas virales, en vez de emplear extractos para fijar la savia en placas de poliestireno empleado en la técnica de DAS-ELISA.

El procedimiento de inmunoimpresión-ELISA empleado en el presente trabajo fue en su modalidad directa. Este protocolo emplea anticuerpos monoclonales 3DF1+3CA5 acoplados a biotina para detectar la presencia de partículas virales, así como fosfatasa alcalina acoplado a estreptavidina como conjugado, como se ilustra en la Figura A.1.A. (Garnsey *et al.*, 1993). El procedimiento para realizar este protocolo consistió de cinco pasos (Figura A.1.B), como se describe a continuación.

Impresión de las membranas. Se emplearon seis pecíolos foliares por árbol, provenientes de igual número de brotes. Cada pecíolo se presionó en dos sitios contiguos sobre una membrana de nitrocelulosa de 7×13 cm, previo corte transversal con tijera por la parte proximal del limbo foliar, sin incluir la base del mismo.

Bloqueo de las membranas. Consistió en bloquear los poros y la superficie de la membrana que no fue impresa con una solución del 1% de albumina de suero bovino (BSA) en agua destilada. Las membranas se mantuvieron en la solución a temperatura ambiente durante una hora. Al término de la cual se lavó con el amortiguador de lavado PBS-Tween agitándola durante cinco minutos.

Incubación de las membranas con el anticuerpo. Sobre las membranas se añadió una mezcla de anticuerpos monoclonales (3DF1+3CA5 acoplados a biotina). La cantidad fue de 0.1 mg/ml de anticuerpo disuelto en amortiguador de conjugado a pH de 7.2. Las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Al término de la cual se lavó con el amortiguador de lavado PBS-Tween agitándola durante cinco minutos.

Incubación de las membranas con el conjugado. Sobre las membranas se añadió 0.1 mg/ml de conjugado (fosfatasa alcalina acoplado a estreptavidina) disuelto en amortiguador de conjugado a pH de 7.2. Las membranas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Al término de la cual se lavó con el amortiguador de lavado PBS-Tween agitándola durante cinco minutos.

Incubación de las membranas con el sustrato. Sobre las membranas se añadió una pastilla (2 g) del sustrato precipitante consistente de nitroblue de tetrazolio y bromo cloro indolil fosfato (NBT-BCIP) disuelto en 10 ml de agua destilada. Se incubó a temperatura ambiente hasta que aparecieron los precipitados de color violeta en los controles positivos, lo cual ocurrió en 10 y 15 minutos.

Detención de la reacción. Una vez que aparecieron los precipitados en los controles positivos, se detuvo la reacción lavando las membranas con la solución de lavado, agitando el recipiente durante cinco minutos.

Para evitar posibles daños a las membranas y los reflejos que produce el agua, las membranas se secaron el papel absorbente a temperatura ambiente. Una vez secos se empleó un microscopio estereoscópico para realizar las lecturas con una magnificación de $10\times$.

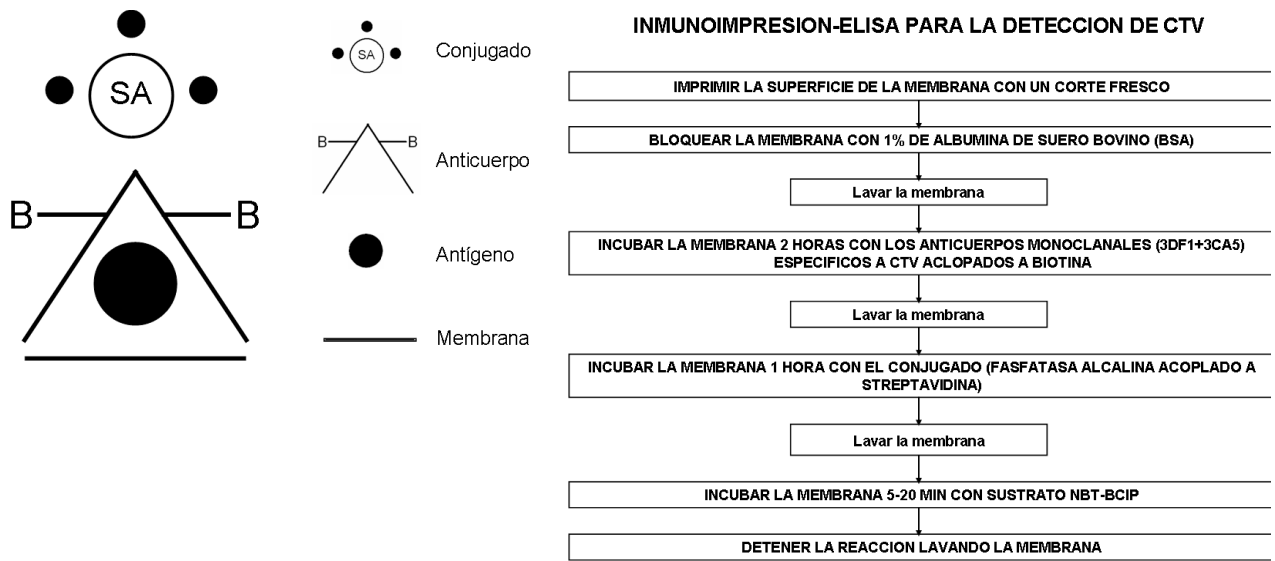


Figura A.1. A) Diagrama del protocolo de inmunoprecipitación-ELISA empleado para la detección del CTV. B) Esquema del protocolo de inmunoprecipitación-ELISA para la detección del CTV con el método de biotina-streptavidina (BIO/SA).

A.6. Literatura citada

- Garnsey, S. M., T. A. Permar, M. Cambra, and C. T. Henderson. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus*, pp. 39-50. *In*: Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologist. P. Moreno, J. V. da Gracca, Timmer (eds.). Riverside, California.
- Loeza K., E. 2003. Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del citrus tristeza closterovirus. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Tex. Edo. de México. 85p.

APÉNDICE B

B.1. Mapas de dispersión de los huertos censados

Las características de las huertas incluidas en este trabajo se muestra en el Cuadro B.1. Para cada uno de los huertas se construyó un mapa de incidencia al virus de la tristeza de los cítricos. Los mapas se construyeron tomando como referencia el foco seleccionado en torno al cual se censo un área restrictiva de 9 hileras por 49 árboles (Loeza, 2003).

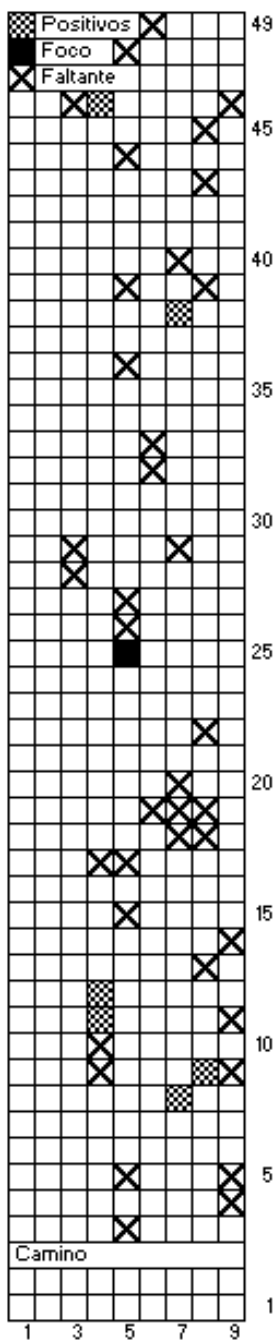
Cuadro B.1. Características de las huertas muestreadas para validar el patrón espacial de dispersión del virus de la tristeza de los cítricos. Tamaulipas, México. 2004.

Huerta ¹	Extensión (ha)	Edad (años)	Variedad	Focos		Muestras ³
				Total	Seleccionado ²	
G1	13	20	Valencia	9	1 ²	432(39)392
G2	27	12	Valencia	9	1	432(18)414
G3	85	10	Mandarina	29	1 ²	441(50)390
L1	16	40	Valencia		1	441(51)384
L2	24	15	Val. Temprana	2	1	428(1)427
L3	50	14	Navel Temprana	4	1 ²	441(7)433
M1	13.4	20	Valencia		5	2100(76)2024
P1	18	13	Val. Temprana	40	4	1715(15)1700
P2	14	12	Marrs		1 ²	441(0)441
P3	10	20	Valencia	4	1	392(7)385
V1	8	16	Valencia		1 ²	441(1)440

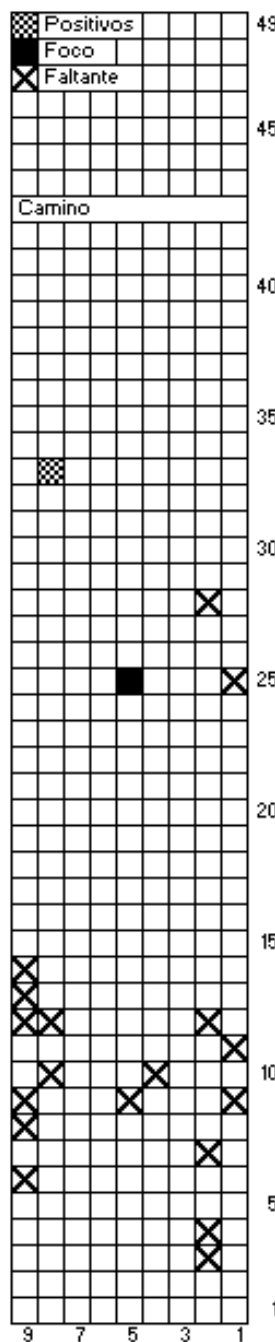
¹Inicial del municipio donde se encuentran ubicados las huertas.

²Focos erradicados en mayo de 2003.

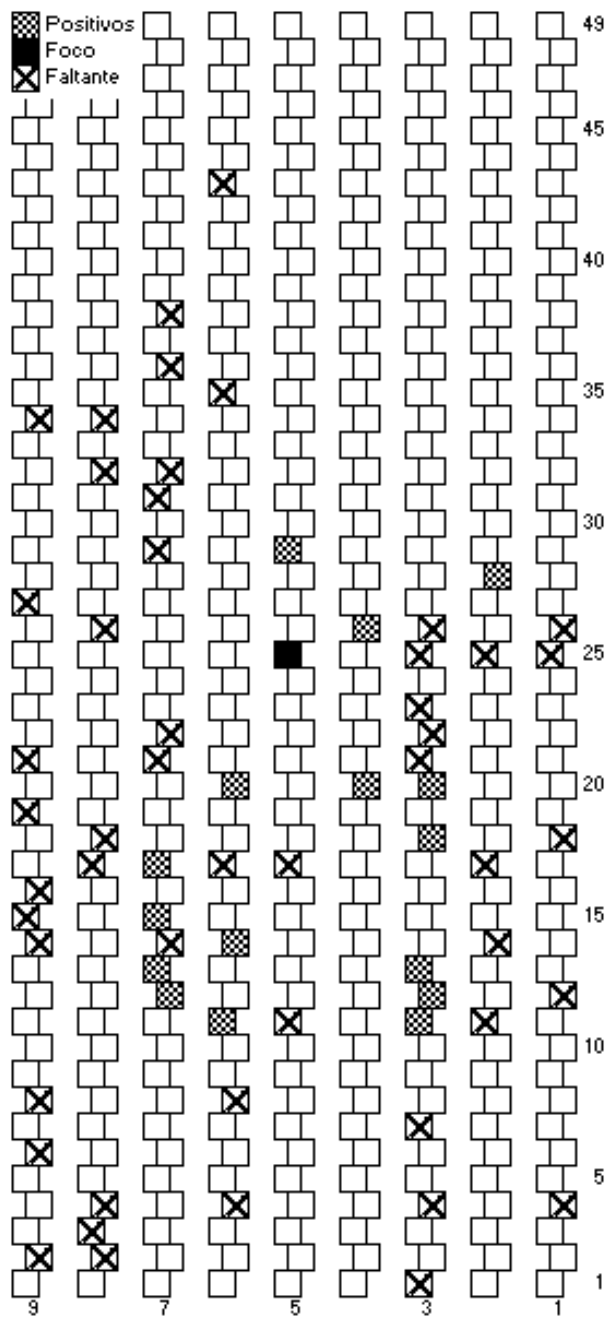
³Tamaño del foco (Árboles faltantes) Muestras procesadas.



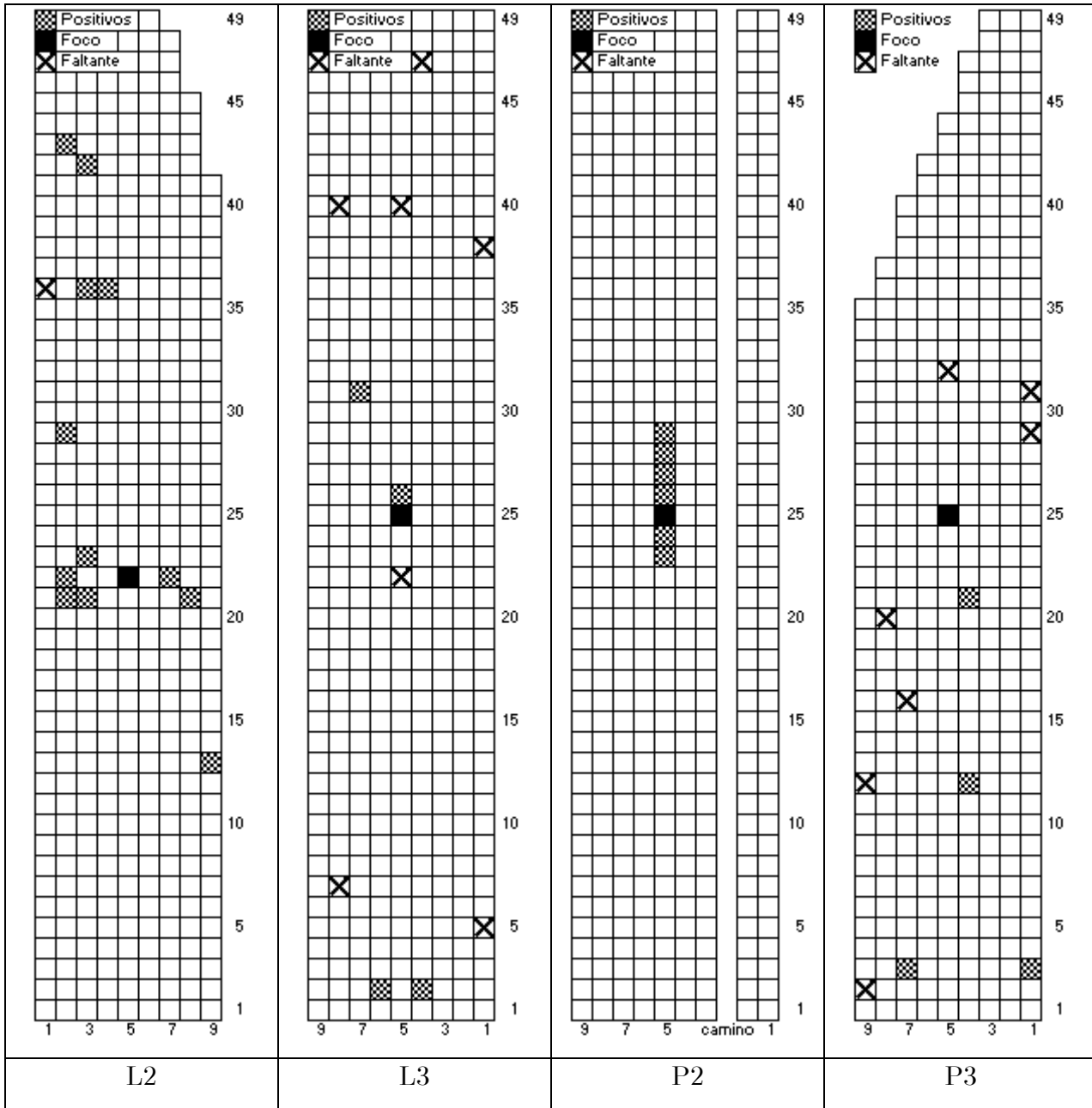
G1

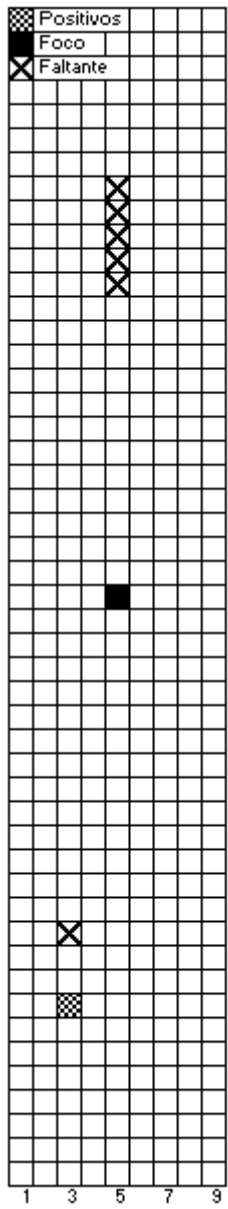


G2

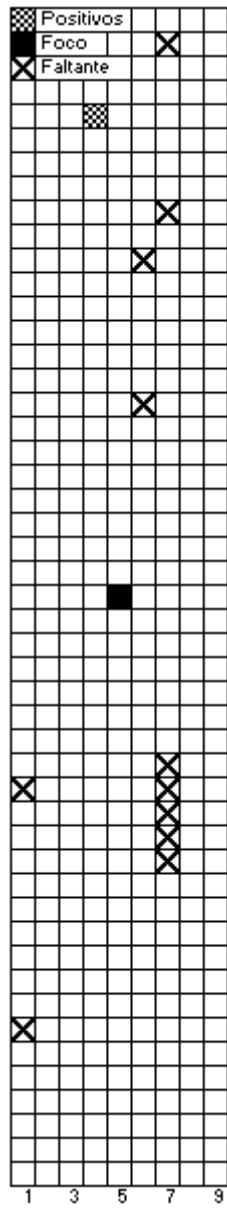


G3

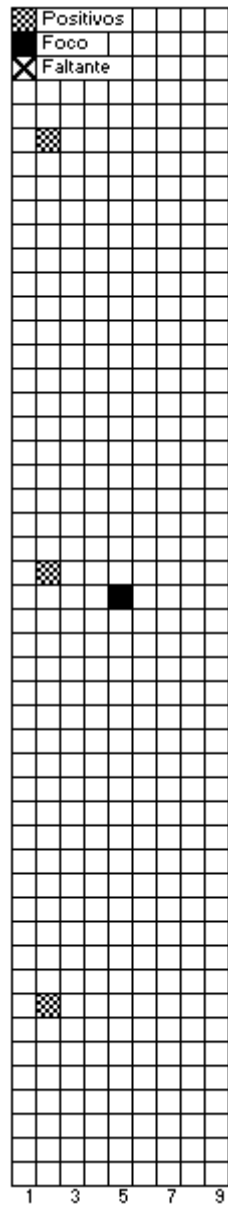




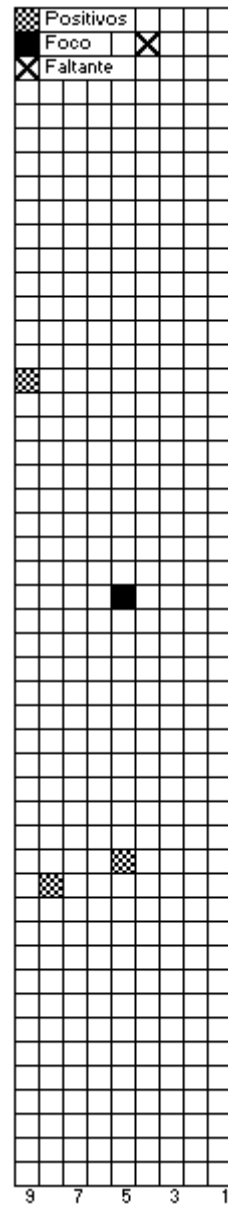
P1.A



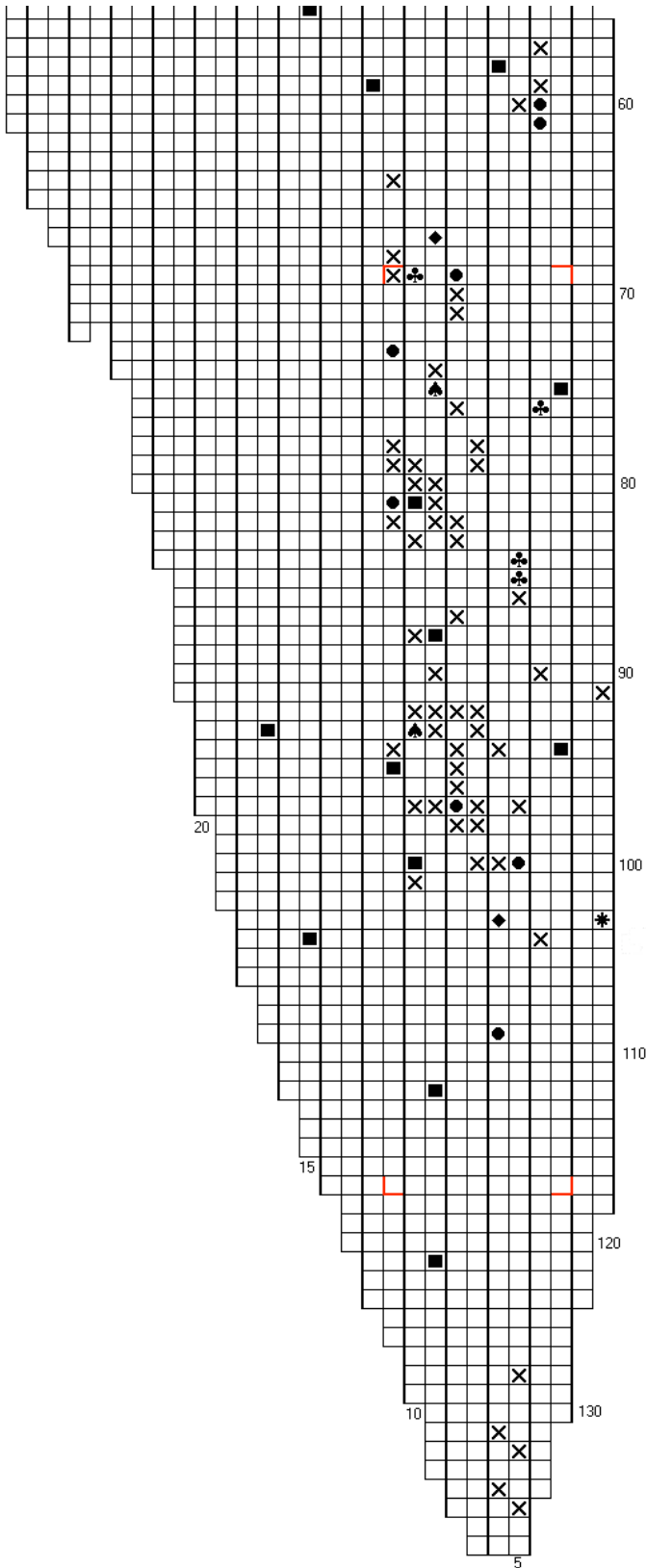
P1.B



P1.C

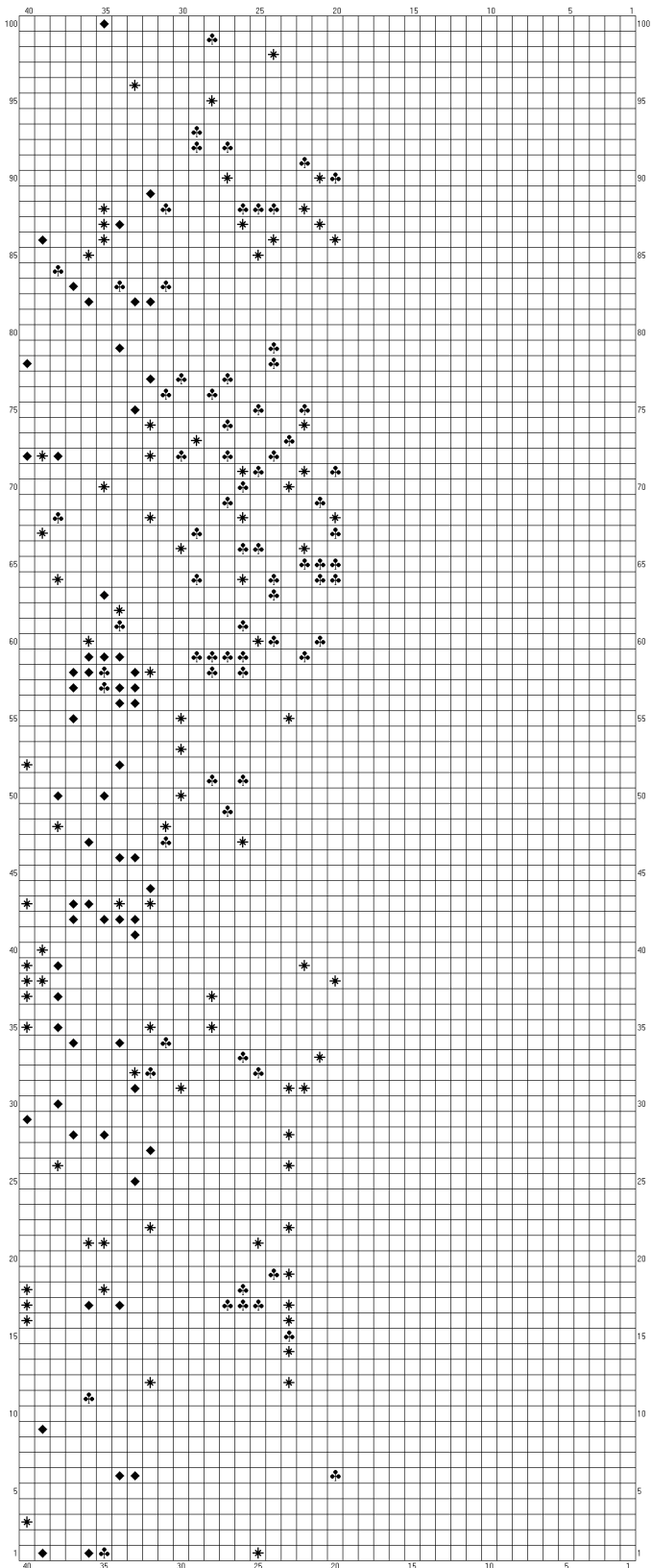


P1.D



- Árbol faltante
- ✕ Erradicado en mayo de 2003
- ⊗ Octubre de 2001
- Diciembre de 2001
- ◆ Septiembre de 2002
- * Enero de 2004

L1



- * Diciembre de 2002
- ◆ Enero de 2003
- ⚡ Enero de 2004

M1

B.2. Literatura citada

Loeza K., E. 2003. Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del citrus tristeza closterovirus. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Tex. Edo. de México. 85p.

APÉNDICE C

C.1. Intervalos de muestreo para cada tamaño de cuadrante

Cuadro C.1. Número de muestras para hileras y columnas, intervalos de muestreo para cada tamaño de muestra y número de muestras sistemáticas simples que se puede obtener para cada tamaño de muestra.

1x2 Área	Muestras		Intervalo		Simples	
	H	A	H	A	H	A
5.0	6	16	6	6	6	3
7.5	8	19	5	5	5	2
10.0	9	22	4	4	4	2
12.5	11	23	3	4	3	2
15.0	12	25	3	3	3	2

2x1 Área	Muestras		Intervalo		Simples	
	H	A	H	A	H	A
5.0	6	16	6	6	3	6
7.5	8	19	4	5	2	5
10.0	9	22	4	4	2	4
12.5	10	25	3	4	2	4
15.0	10	30	3	3	2	3

2x3 Área	Muestras		Intervalo		Simples	
	H	A	H	A	H	A
5.0	4	8	9	12	5	4
7.5	5	10	7	9	4	3
10.0	5	13	7	7	4	2
12.5	6	14	6	7	3	2
15.0	6	16	6	6	3	2

3x2 Área	Muestras		Intervalo		Simples	
	H	A	H	A	H	A
5.0	3	11	12	9	4	4
7.5	4	12	9	8	3	4
10.0	5	13	7	7	2	3
12.5	6	14	6	7	2	3
15.0	6	16	6	6	2	3

3x4	Muestras		Intervalo		Simples	
	H	A	H	A	H	A
5.0	3	6	12	16	4	4
7.5	3	8	12	12	4	3
10.0	4	8	9	12	3	3
12.5	5	8	7	12	2	3
15.0	5	10	7	9	2	2

4x3 Área	Muestras		Intervalo		Simples	
	H	A	H	A	H	A
5.0	3	6	12	16	3	5
7.5	3	8	12	12	3	4
10.0	4	8	9	12	2	4
12.5	5	8	7	12	2	4
15.0	5	10	7	9	2	3

2x2 Área	Muestras		Intervalo		Simples	
	H	A	H	A	H	A
5.0	5	10	7	9	4	5
7.5	6	13	6	7	3	3
10.0	6	16	6	6	3	3
12.5	7	18	5	5	2	2
15.0	8	19	4	5	2	2

4x4 Área	Muestras		Intervalo		Simples	
	H	A	H	A	H	A
5.0	2	6	18	16	5	4
7.5	3	6	12	16	3	4
10.0	3	8	12	12	3	3
12.5	4	8	9	12	2	3
15.0	4	10	9	9	2	2

3x3 Área	Muestras		Intervalo		Simples	
	H	A	H	A	H	A
5.0	3	7	12	14	4	4
7.5	4	8	9	12	3	4
10.0	4	11	9	8	3	3
12.5	5	11	7	8	2	3
15.0	5	13	5	5	2	2

C.2. Estimaciones obtenidas por simulación

Cuadro C.2. Incidencia (\hat{p}_D) y varianza (\hat{s}_D^2) estimada por simulación con 10000 re-muestras bootstrap, número promedio de plantas (n_e) muestreadas, cuadrado medio del error de la incidencia estimada con simulación con respecto al valor verdadero, e incidencia (\bar{p}_D) y varianza ($V(\bar{p}_D)$) estimada con enumeración de las muestras sistemáticas simples. Censo de 2002.

1x1	Simulación					Verdadero		
	Área	\hat{p}_D	s_D^2	n_e	cme	\bar{p}_D	$V(\bar{p}_D)$	
1x1	5.0	0.02078	0.0001338	198	0.0001337	0.935	0.02462	0.0001877
	7.5	0.02091	0.0000892	297	0.0000892	0.898	0.01871	0.0001464
	10.0	0.02090	0.0000605	390	0.0000605	0.896	0.02222	0.0000745
	12.5	0.02084	0.0000925	490	0.0000925	0.833	0.01582	0.0000091
	15.0	0.02088	0.0000653	592	0.0000653	0.828	0.01900	0.0000262
1x2	5.0	0.02081	0.0001390	192	0.0001390	0.887	0.01881	0.0001210
	7.5	0.02087	0.0001081	304	0.0001081	0.933	0.02138	0.0000849
	10.0	0.02097	0.0000792	396	0.0000792	0.877	0.01926	0.0000445
	12.5	0.02103	0.0000644	506	0.0000645	0.877	0.01713	0.0000712
	15.0	0.02118	0.0000554	600	0.0000556	0.889	0.01833	0.0000583
2x3	5.0	0.02083	0.0001497	192	0.0001497	0.872	0.02135	0.0001109
	7.5	0.02076	0.0000921	300	0.0000920	0.924	0.02083	0.0001262
	10.0	0.02080	0.0000817	390	0.0000817	0.909	0.02244	0.0001146
	12.5	0.02069	0.0000395	504	0.0000395	0.939	0.01852	0.0000153
	15.0	0.02071	0.0000358	540	0.0000358	0.958	0.01881	0.0000155
3x4	5.0	0.02049	0.0001686	216	0.0001687	0.887	0.01823	0.0001433
	7.5	0.02049	0.0001350	288	0.0001350	0.823	0.01823	0.0001088
	10.0	0.02052	0.0000713	384	0.0000713	0.917	0.01852	0.0000745
	12.5	0.02058	0.0000549	480	0.0000550	0.935	0.01632	0.0000194
	15.0	0.02058	0.0000443	600	0.0000443	0.926	0.01667	0.0000153
2x2	5.0	0.02079	0.0001212	200	0.0001212	0.937	0.02075	0.0001732
	7.5	0.02072	0.0000718	312	0.0000718	0.951	0.01923	0.0000502
	10.0	0.02073	0.0000464	384	0.0000464	0.961	0.01881	0.0000358
	12.5	0.02072	0.0000425	504	0.0000425	0.933	0.01786	0.0000217
	15.0	0.02074	0.0000561	608	0.0000561	0.902	0.01768	0.0000086

Cuadro C.2. Continuación ...

3x3	Simulación				Verdadero			
	\hat{p}_D	s_D^2	n_e	cme	\bar{p}_D	$V(\bar{p}_D)$		
	5.0	0.02052	0.0001916	189	0.0001917	0.853	0.01885	0.0001364
	7.5	0.02058	0.0000871	288	0.0000871	0.918	0.01852	0.0000810
	10.0	0.02050	0.0000762	396	0.0000762	0.913	0.01824	0.0000479
	12.5	0.02053	0.0000565	495	0.0000565	0.898	0.01582	0.0000183
	15.0	0.02058	0.0000403	585	0.0000403	0.936	0.01709	0.0000131
4x4								
	5.0	0.02075	0.0001312	192	0.0001312	0.90	0.02135	0.0001109
	7.5	0.02057	0.0001396	288	0.0001396	0.86	0.01823	0.0001550
	10.0	0.02052	0.0001085	384	0.0001086	0.78	0.01823	0.0001115
	12.5	0.02052	0.0000437	512	0.0000438	0.95	0.01921	0.0000361
	15.0	0.02051	0.0000367	640	0.0000368	0.94	0.02031	0.0000305
2x1								
	5.0	0.02054	0.0000987	192	0.0000988	0.942	0.01881	0.0000607
	7.5	0.02055	0.0000993	304	0.0000993	0.897	0.01743	0.0000196
	10.0	0.02048	0.0000689	396	0.0000689	0.912	0.01926	0.0000509
	12.5	0.02049	0.0000507	500	0.0000508	0.925	0.02075	0.0000629
	15.0	0.02049	0.0000415	600	0.0000415	0.956	0.02222	0.0000395
3x2								
	5.0	0.02050	0.0001671	198	0.0001672	0.913	0.01894	0.0001515
	7.5	0.02050	0.0000972	288	0.0000973	0.898	0.01852	0.0001112
	10.0	0.02052	0.0000538	390	0.0000539	0.960	0.01709	0.0000409
	12.5	0.02037	0.0000372	504	0.0000373	0.958	0.01852	0.0000442
	15.0	0.02039	0.0000272	576	0.0000274	0.981	0.01881	0.0000275
4x3								
	5.0	0.02060	0.0001838	216	0.0001838	0.885	0.01759	0.0001349
	7.5	0.02053	0.0001225	288	0.0001226	0.838	0.01823	0.0001047
	10.0	0.02057	0.0000556	384	0.0000557	0.963	0.01921	0.0000304
	12.5	0.02058	0.0000512	480	0.0000512	0.939	0.02135	0.0000540
	15.0	0.02057	0.0000400	600	0.0000401	0.946	0.02083	0.0000507

Cuadro C.3. Incidencia (\hat{p}_D) y varianza (\hat{p}_D) estimada por simulación con 10000 re-muestréos bootstrap, número promedio de plantas (n_e) muestreadas, cuadrado medio del error de la incidencia estimada con simulación con respecto al valor verdadero, e incidencia (\bar{p}_D) y varianza ($V(\bar{p}_D)$) estimada con enumeración de las muestras sistemáticas simples. Censo de 2003.

1x1	Simulación					Verdadero	
	\hat{p}_D	s_D^2	n_e	cme		\bar{p}_D	$V(\bar{p}_D)$
5.0	0.03621	0.0002011	198	0.0002013	0.955	0.04261	0.0002390
7.5	0.03603	0.0001441	297	0.0001442	0.882	0.03217	0.0001036
10.0	0.03608	0.0001351	260	0.0001352	0.935	0.03846	0.0000643
12.5	0.03602	0.0002448	490	0.0002448	0.664	0.01582	0.0000091
15.0	0.03602	0.0001502	592	0.0001502	0.757	0.02787	0.0000378
1x2							
5.0	0.03621	0.0002283	192	0.0002285	0.911	0.03009	0.0001554
7.5	0.03629	0.0001977	304	0.0001980	0.873	0.03849	0.0001667
10.0	0.03625	0.0001175	396	0.0001177	0.921	0.03125	0.0000573
12.5	0.03622	0.0001314	506	0.0001316	0.839	0.02240	0.0000946
15.0	0.03623	0.0000688	600	0.0000690	0.942	0.02944	0.0000673
2x3							
5.0	0.03579	0.0002344	192	0.0002344	0.911	0.03672	0.0001722
7.5	0.03584	0.0001589	300	0.0001589	0.920	0.03639	0.0001434
10.0	0.03602	0.0001230	390	0.0001231	0.914	0.03782	0.0001426
12.5	0.03576	0.0000797	504	0.0000797	0.931	0.02877	0.0000469
15.0	0.03577	0.0000701	576	0.0000701	0.924	0.03009	0.0000308
3x4							
5.0	0.03562	0.0005403	216	0.0005403	0.643	0.03356	0.0005318
7.5	0.03582	0.0004737	288	0.0004737	0.533	0.03356	0.0004869
10.0	0.03575	0.0001097	384	0.0001097	0.928	0.03472	0.0000934
12.5	0.03582	0.0000653	480	0.0000653	0.949	0.03299	0.0000049
15.0	0.03578	0.0000644	600	0.0000644	0.944	0.03333	0.0000250
2x2							
5.0	0.03575	0.0002106	200	0.0002106	0.909	0.03575	0.0002357
7.5	0.03568	0.0001573	312	0.0001573	0.914	0.03027	0.0000984
10.0	0.03556	0.0000893	384	0.0000893	0.941	0.03009	0.0000424
12.5	0.03575	0.0001069	504	0.0001069	0.908	0.03026	0.0001621
15.0	0.03545	0.0001057	608	0.0001058	0.857	0.03618	0.0001285

Cuadro C.3. Continuación ...

3x3	Simulación				Verdadero			
	\hat{p}_D	s_D^2	n_e	cme	\bar{p}_D	$V(\bar{p}_D)$		
	5.0	0.03552	0.0006257	189	0.0006257	0.705	0.03241	0.0006679
	7.5	0.03552	0.0001409	288	0.0001410	0.923	0.03472	0.0000884
	10.0	0.03559	0.0001122	396	0.0001122	0.923	0.03395	0.0000724
	12.5	0.03566	0.0002026	220	0.0002026	0.928	0.03199	0.0000482
	15.0	0.03559	0.0001782	260	0.0001782	0.923	0.03333	0.0000314
4x4								
	5.0	0.03563	0.0004938	192	0.0004938	0.803	0.03672	0.0004380
	7.5	0.03552	0.0004710	288	0.0004710	0.576	0.03356	0.0004668
	10.0	0.03560	0.0004204	384	0.0004204	0.495	0.03356	0.0004136
	12.5	0.03542	0.0000636	512	0.0000637	0.967	0.03646	0.0000810
	15.0	0.03535	0.0002408	160	0.0002409	0.931	0.03750	0.0000525
2x1								
	5.0	0.03552	0.0001593	192	0.0001593	0.973	0.03009	0.0000861
	7.5	0.03530	0.0001694	304	0.0001696	0.919	0.03421	0.0001822
	10.0	0.03549	0.0001029	396	0.0001030	0.938	0.03125	0.0000653
	12.5	0.03543	0.0001339	500	0.0001338	0.841	0.03575	0.0000644
	15.0	0.03532	0.0001166	600	0.0001168	0.823	0.03861	0.0000291
3x2								
	5.0	0.03548	0.0005555	198	0.0005555	0.718	0.03472	0.0006405
	7.5	0.03528	0.0001457	288	0.0001459	0.925	0.03472	0.0001125
	10.0	0.03533	0.0000820	390	0.0000822	0.964	0.03333	0.0000373
	12.5	0.03541	0.0000887	504	0.0000888	0.938	0.02877	0.0001007
	15.0	0.03536	0.0000545	576	0.0000547	0.953	0.03009	0.0000298
4x3								
	5.0	0.03539	0.0005181	216	0.0005182	0.686	0.03395	0.0004792
	7.5	0.03538	0.0004421	288	0.0004422	0.572	0.03356	0.0003825
	10.0	0.03519	0.0000881	384	0.0000884	0.947	0.03646	0.0000729
	12.5	0.03530	0.0000621	480	0.0000623	0.972	0.03672	0.0000336
	15.0	0.03531	0.0000670	600	0.0000672	0.939	0.03639	0.0000421

Cuadro C.4. Incidencia (\hat{p}_D) y varianza (\hat{p}_D) estimada por simulación con 10000 re-muestréos bootstrap, número promedio de plantas (n_e) muestreadas, cuadrado medio del error de la incidencia estimada con simulación con respecto al valor verdadero, e incidencia (\bar{p}_D) y varianza ($V(\bar{p}_D)$) estimada con enumeración de las muestras sistemáticas simples. Censo de 2004.

1x1	Simulación				Verdadero		
	\hat{p}_D	s_D^2	n_e	cme	\bar{p}_D	$V(\bar{p}_D)$	
5.0	0.05476	0.0002787	198	0.0002789	0.934	0.06503	0.0002802
7.5	0.05478	0.0002207	297	0.0002209	0.905	0.05499	0.0001562
10.0	0.05480	0.0000862	390	0.0000865	1.000	0.05897	0.0000906
12.5	0.05477	0.0004349	490	0.0004351	0.664	0.03724	0.0000549
15.0	0.05480	0.0002372	592	0.0002375	0.763	0.04983	0.0000606
1x2							
5.0	0.05479	0.0003304	192	0.0003307	0.909	0.05064	0.0002827
7.5	0.05489	0.0002736	304	0.0002740	0.900	0.05921	0.0001104
10.0	0.05499	0.0001674	396	0.0001679	0.913	0.05208	0.0000940
12.5	0.05494	0.0002134	506	0.0002138	0.821	0.04348	0.0001432
15.0	0.05503	0.0001228	600	0.0001234	0.895	0.04944	0.0000978
2x3							
5.0	0.05490	0.0002738	192	0.0002742	0.940	0.05573	0.0002444
7.5	0.05496	0.0002106	300	0.0002111	0.912	0.05583	0.0001984
10.0	0.05510	0.0001756	390	0.0001763	0.907	0.05801	0.0001429
12.5	0.05508	0.0001448	504	0.0001455	0.886	0.05026	0.0001032
15.0	0.05519	0.0001215	576	0.0001224	0.872	0.05064	0.0000697
3x4							
5.0	0.05576	0.0006767	216	0.0006789	0.706	0.05179	0.0006972
7.5	0.05582	0.0005743	288	0.0005767	0.616	0.05179	0.0006178
10.0	0.05580	0.0001344	384	0.0001368	0.946	0.05353	0.0001418
12.5	0.05580	0.0000879	480	0.0000903	0.968	0.05278	0.0000125
15.0	0.05592	0.0001075	600	0.0001103	0.925	0.05250	0.0000354
2x2							
5.0	0.05483	0.0002900	200	0.0002903	0.951	0.05425	0.0003532
7.5	0.05488	0.0002183	312	0.0002187	0.906	0.05235	0.0001438
10.0	0.05484	0.0001514	384	0.0001517	0.928	0.05064	0.0000604
12.5	0.05498	0.0001229	504	0.0001234	0.934	0.05109	0.0000618
15.0	0.05499	0.0001612	608	0.0001617	0.833	0.05633	0.0000370

Cuadro C.4. Continuación ...

3x3	Simulación					Verdadero		
	\hat{p}_D	s_D^2	n_e	cme		\bar{p}_D	$V(\bar{p}_D)$	
	5.0	0.05474	0.0008312	189	0.0008314	0.686	0.05159	0.0009221
	7.5	0.05510	0.0001810	288	0.0001817	0.938	0.05353	0.0001677
	10.0	0.05512	0.0002145	396	0.0002153	0.879	0.05247	0.0001371
	12.5	0.05540	0.0001651	495	0.0001664	0.878	0.05152	0.0001275
	15.0	0.05547	0.0000940	585	0.0000955	0.937	0.05385	0.0000562
4x4								
	5.0	0.05607	0.0003762	192	0.0003795	0.896	0.05573	0.0003258
	7.5	0.05590	0.0005853	288	0.0005879	0.668	0.05179	0.0005414
	10.0	0.05584	0.0005082	384	0.0005107	0.533	0.05179	0.0005040
	12.5	0.05590	0.0000864	512	0.0000891	0.971	0.05599	0.0000911
	15.0	0.05600	0.0001125	640	0.0001156	0.880	0.05625	0.0000452
2x1								
	5.0	0.05473	0.0002727	192	0.0002729	0.955	0.05064	0.0001833
	7.5	0.05465	0.0002165	304	0.0002167	0.947	0.05263	0.0001363
	10.0	0.05461	0.0001297	396	0.0001298	0.967	0.05208	0.0000796
	12.5	0.05463	0.0002406	500	0.0002407	0.800	0.05425	0.0000604
	15.0	0.05465	0.0001909	600	0.0001910	0.804	0.05778	0.0000441
3x2								
	5.0	0.05485	0.0007442	198	0.0007444	0.677	0.05303	0.0007780
	7.5	0.05474	0.0002846	288	0.0002848	0.875	0.05353	0.0002441
	10.0	0.05495	0.0001253	390	0.0001258	0.949	0.05385	0.0001227
	12.5	0.05531	0.0001275	504	0.0001286	0.909	0.05026	0.0001255
	15.0	0.05528	0.0001045	576	0.0001055	0.921	0.05064	0.0000507
4x3								
	5.0	0.05522	0.0006711	216	0.0006720	0.717	0.05154	0.0006483
	7.5	0.05519	0.0005453	288	0.0005461	0.652	0.05179	0.0005093
	10.0	0.05538	0.0001276	384	0.0001288	0.946	0.05599	0.0001322
	12.5	0.05545	0.0000899	480	0.0000913	0.965	0.05573	0.0000583
	15.0	0.05566	0.0001047	600	0.0001067	0.935	0.05583	0.0000859

C.3. Distribución muestral aproximada del estimador de la incidencia

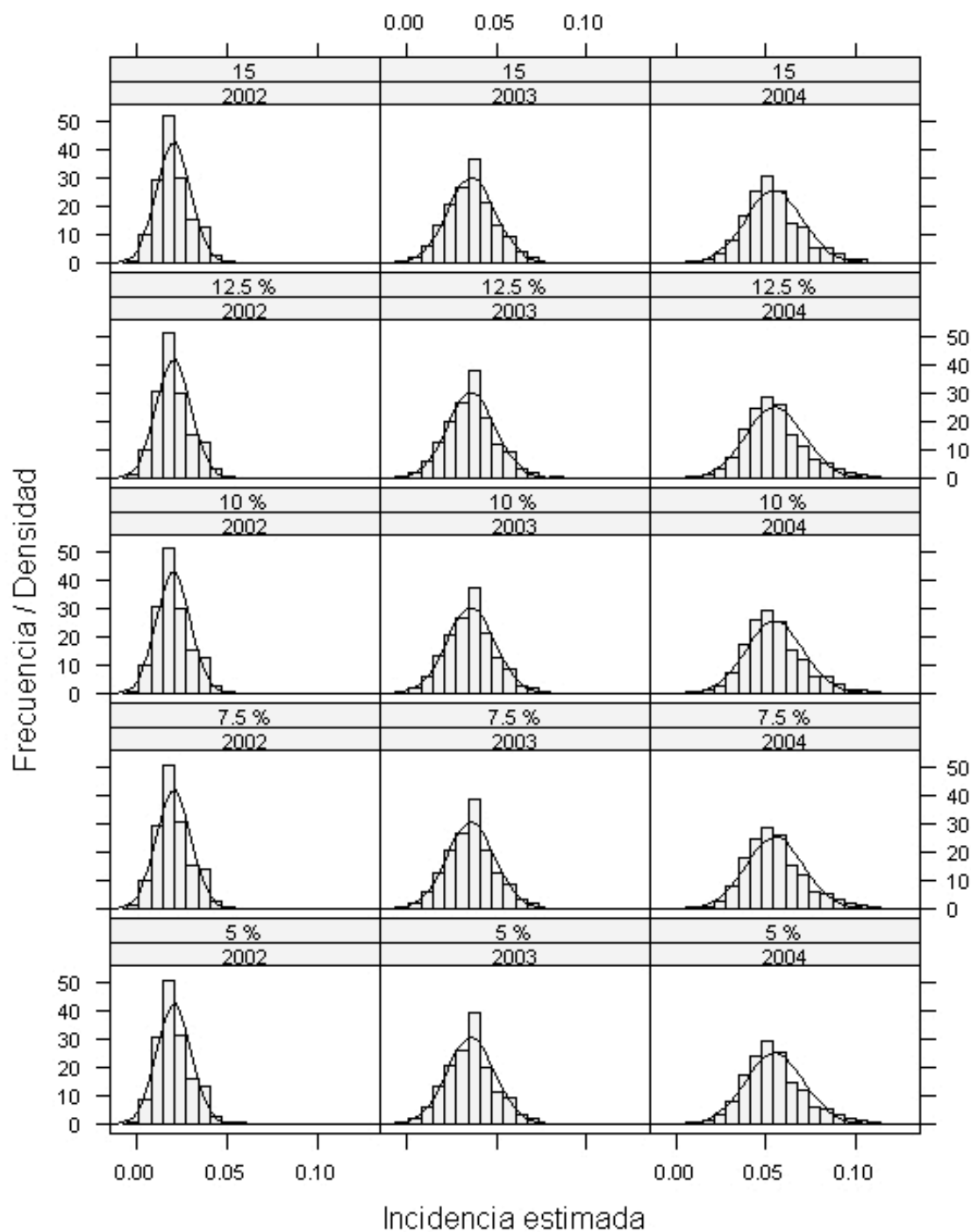


Figura C.1. Distribución muestral aproximada del estimador de la incidencia de plantas positivas basado en 10000 muestras bootstrap para el muestreo de árboles individuales.

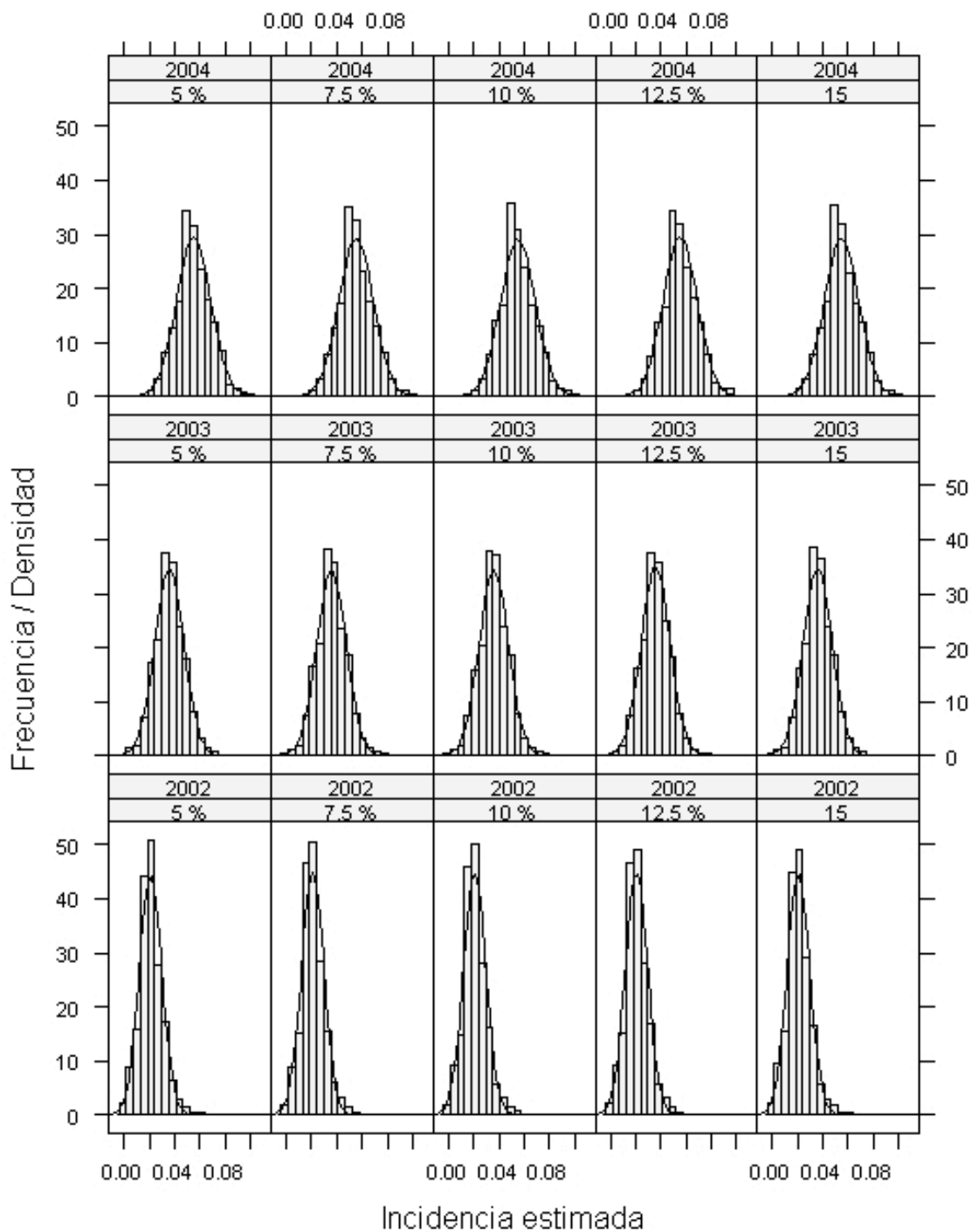


Figura C.2. Distribución muestral aproximada del estimador de la incidencia de plantas positivas basado en 10000 muestras bootstrap para el cuadrante de tamaño 2x3.

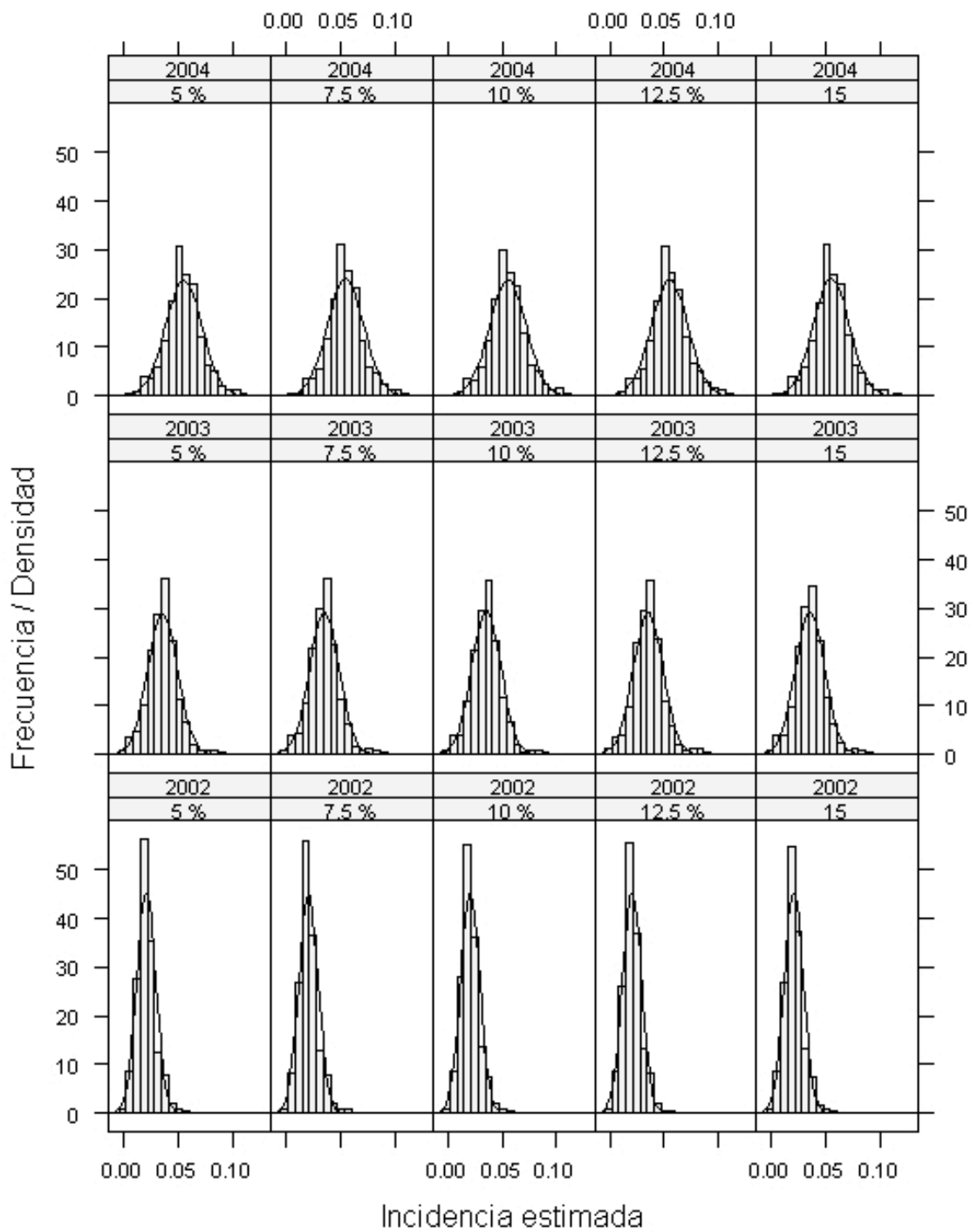


Figura C.3. Distribución muestral aproximada del estimador de la incidencia de plantas positivas basado en 10000 muestras bootstrap para el cuadrante de tamaño 2x2.