



CITRICOS

# Inmunoimpresión-ELISA: Método ideal para detección del virus de la tristeza de los cítricos

M. Cambra, M<sup>a</sup> T. Gorris,  
E. Camarasa, M. P. Román,  
G. Narváez, M<sup>a</sup> E. Terrada  
y M<sup>a</sup> C. Martínez

DTO. PROTECCIÓN VEGETAL Y BIOTECNOLOGÍA,  
LAB. VIROLOGÍA E INMUNOLOGÍA,  
INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES  
AGRARIAS (IVIA).



**E**l virus de la tristeza de los cítricos (CTV) causa la enfermedad más grave del cultivo en España donde unos 35 millones de naranjos y mandarinos injertados sobre naranjo amargo han muerto. El control eficaz de la enfermedad se consigue, en las circunstancias españolas, con el uso de variedades libres de virus injertadas sobre patrones tolerantes a tristeza, producidas en el marco de un programa de certificación. La producción de plantas libres de CTV en los viveros se logra efectivamente aplicando técnicas de diagnóstico como la inmunoimpresión-ELISA, puesta a punto en el IVIA. El sistema en forma de estuche comercial completo, permite realizar de forma muy simple, diagnósticos de CTV fiables y a precio económico que posibilita su uso a gran escala. El método consiste en cuatro etapas básicas: 1. Recolección e impresión de secciones de material vegetal en membranas, 2. Bloqueo de la membrana y reacción, 3. Lavado y 4. Revelado y lectura de resultados. Estas etapas se pueden realizar en condiciones de campo o sin necesidad de instalaciones, por personal no experto en laboratorio. El método es más sensible que la realización de extractos (ELISA convencional) y tanto como inmunocaptura-PCR. Se trata del método que ha revolucionado el diagnóstico de tristeza por ser el más propicio para análisis rutinario de CTV en numerosas muestras necesarias en control de viveros y grandes prospecciones.

## INTRODUCCIÓN

El virus de la tristeza de los cítricos (Citrus tristeza virus-CTV), causa la enfermedad viral más importante del cultivo debido no sólo a la gravedad de sus síntomas (**foto 1**), sino también a su fácil dispersión natural por pulgones. Por ello, son fundamentales estrategias de control.

El virus está presente en todas las zonas cítricas mundiales a las que originariamente llegó con material vegetal infectado. La enfermedad es endémica (infecta al práctico 100% de los árboles) en las principales áreas cítricas de Asia (China y Japón), África del Sur y Australia y en muchas de las zonas cítricas de América (Argentina, Brasil, Uruguay y Venezuela). En todas estas impor-

Foto 1. Típicos síntomas (colapsos y decaimientos lentos) causados por el virus de la tristeza en árboles de naranjo dulce injertados sobre naranjo amargo.





Foto 2. Impresión de muestras: la sección limpia recién realizada de brotes o de pedicelo de hojas es presionada suavemente sobre la membrana para dejar una huella o impronta.

tantes citriculturas predominan aislados del virus muy agresivos, capaces de provocar acanaladuras en la madera de las variedades. Estos daños directos debilitan al árbol, que presentará pobre producción y de escaso calibre, y una importante reducción en su volumen, especialmente si la infección se produjo en vivero o en los primeros años de cultivo.

En todas estas zonas cítricas el **patrón naranjo amargo desapareció hace años**, ya que las variedades injertadas sobre él decayeron rápidamente, causando la muerte de unos 40 millones de árboles. En los países citados, el CTV se dispersa muy fácilmente, ya que el pulgón pardo de los cítricos (*Toxoptera citricida*), está presente. **Este pulgón es el vector más eficaz de la enfermedad** y además, causa por sí solo una importante plaga en los cítricos.

En otras zonas cítricas importantes, los aislados mayoritarios de CTV son comunes o poco agresivos, pero **el virus infectará en un futuro próximo al 100% de los árboles en España, Israel y Estados Unidos de América (Florida y California)**. En todas estas zonas, excepto en España,

se han detectado aislados agresivos que, aunque minoritarios de momento, se dispersan en campo. En el caso de Florida, y debido a la presencia de *T. citricida*, es posible predecir la desaparición del naranjo amargo como patrón y la presencia de problemas en las nuevas plantaciones realizadas con patrones tolerantes a tristeza, pero incapaces de evitar los daños directos a las variedades.

### EVOLUCIÓN DEL CTV EN ESPAÑA

En España, cuarto productor mundial de cítricos, es el país donde más árboles injertados sobre naranjo amargo han muerto desde que en 1957 se produjo la manifestación epidémica de la enfermedad, probablemente introducida 30 años antes. Desde 1957 hasta 1989 (en 32 años) se estima que desaparecieron unos 20 millones de árboles injertados sobre naranjo amargo. La mayoría de ellos en Valencia, aunque también en algunos municipios de Almería, Castellón, Murcia y Tarragona, murieron muchos árboles. **En toda esa época, el tráfico de material vegetal infectado fue el factor de dispersión más importante.** Los pulgones *Toxoptera aurantii* y *Aphis spiraecola* (mayoritarios en todas las zonas cítricas españolas), considerados vectores poco eficaces, fueron dispersando poco a poco el virus a corta y media distancia.

Desde 1989 hasta la actualidad *Aphis gossypii* se ha convertido en **mayoritario en muchas zonas cítricas españolas**. Este hecho ha provocado una rápida dispersión del CTV y la desaparición, en los últimos 9 años, de unos 15 millones de árboles injertados sobre naranjo amargo, habiendo afectado hasta la fecha a un total de unos 35 millones de árboles. Además, se estima que en los próximos 10 años podrían morir unos 12 millones más. **Cuando la enferme-**

**dad, directa o indirectamente, haya hecho desaparecer al patrón naranjo amargo, habrán muerto unos 50 millones de árboles en España.** En otros países cítricos del Mediterráneo y de América, el virus de la tristeza está presente aunque no se dispersa suficientemente y todavía no ha causado la muerte masiva de árboles injertados sobre naranjo amargo. No obstante, el aumento de las poblaciones del pulgón del algodón *A. gossypii* o la introducción de *T. citricida*, ya presente en las islas Madeira (Portugal) zona de influencia hacia el Mediterráneo, o la presencia en el Caribe, América Central y del Sur, y USA (Florida), representan un riesgo grave para muchas citriculturas en las que todavía son mayoritarias las plantaciones sobre naranjo amargo. En estas zonas deberían realizarse amplias prospecciones para conocer el porcentaje real de infección y estudios epidemiológicos que permitiesen predecir el futuro comportamiento de la enfermedad.

**El control de la enfermedad de la tristeza se logra eficazmente en países donde no existen aislados agresivos. El uso de variedades libres de virus injertadas sobre patrones tolerantes a la tristeza, producidos en el marco de un programa de certificación, constituye una solución segura. Esta solución tiene además futuro si se logra evitar la introducción de aislados agresivos de CTV. Esta es la estrategia que se ha seguido en España, donde han sido comercializados unos 80 millones de plantas libres de virus e injertadas sobre patrones tolerantes.**

La producción de plantas libres de CTV en España, posee no solo la ventaja de contribuir a no distribuir más una enfermedad existente, sino también la de evitar la posible dispersión desde los viveros de aislados agresivos que pudieran introducirse. Además, la producción de plantas

injertadas sobre *Citrus macrophylla* libres de CTV, asegura la ausencia de problemas si las plantaciones se realizan en zonas con bajo porcentaje de infección. Los plantones infectados en vivero o en los primeros años de cultivo, quedarían muy reducidos de tamaño y con estrías en la madera del patrón *C. macrophylla*.

La producción de plantas sin CTV y el control de la enfermedad, requieren medidas de lucha directas e indirectas. Los programas de erradicación y los de disminución de inóculo, las prospecciones y estudios epidemiológicos, los controles en frontera o en cuarentena y el análisis rutinario de CTV en la producción de plantas en vivero son indispensables para el control, pero exigen capacidad técnica y la realización de numerosos controles sanitarios y análisis de CTV en material vegetal. Estos diagnósticos y detecciones deben realizarse con técnicas sensibles y fiables, pero que posean, además, la capacidad de ser aplicadas a gran escala. La disponibilidad de este tipo de técnicas es esencial para la lucha contra el CTV y la enfermedad que produce.

#### TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE CTV, VENTAJAS E INCONVENIENTES

La identificación de CTV por síntomas en campo no es segura, además la ausencia de síntomas no implica que el virus no esté presente ya que este puede albergarse en plantas tolerantes.

El método clásico de diagnóstico de CTV ha sido, hasta la puesta a punto de la técnica inmunoenzimática ELISA, la inoculación de limas mexicanas de semilla en invernadero. Tras un período de 2 a 6 meses de cultivo a 22-26°C, las limas injertadas con material infectado por CTV, mostrarán aclarado discontinuo de nervios y punteaduras y estrías en la madera de los brotes. El método es sensible para la mayoría de aislados de CTV que



Foto 3. La impresión de muestras se puede realizar directamente en campo o en laboratorio.

inducen claros síntomas en lima, pero no es fiable para aislados poco agresivos en lima o que no induzcan síntomas en esta planta hospedadora. Estos aislados son relativamente frecuentes en el Mediterráneo y se dispersan fácilmente por *A. gossypii*. Pero los grandes inconvenientes de la prueba biológica en lima mexicana son el excesivo tiempo que dura una detección y la imposibilidad de aplicarla de forma rutinaria y económica a gran escala.

Las enormes ventajas de los métodos serológicos ELISA, alta sensibilidad, bajo coste, rapidez, fiabilidad y capacidad de uso masivo, han impuesto la técnica de manera que la inmensa mayoría de análisis de CTV se realizan actualmente por ELISA, utilizando anticuerpos monoclonales específicos o policlonales procedentes de antisueros.

**Entre los hitos más trascendentes en la historia de la Fitopatología, figura la puesta a punto de la técnica ELISA en microplacas por Clark y Adams en 1977. En el caso del CTV, la importancia de la técnica ELISA ha sido tal desde su puesta a punto por Cambra y colaboradores y Bar-Joseph y colaboradores**

**en 1979, que ha permitido realizar en los últimos 20 años más de 3'5 millones de análisis de CTV en todo el mundo. Ello ha supuesto multiplicar por 25 el número de análisis que se habían realizado mediante lima durante los 40 años precedentes a la puesta a punto de la técnica ELISA. Tal número de análisis ha hecho posible avanzar espectacularmente en el conocimiento del virus y de su patogenia, epidemiología y control.**

La técnica ELISA es hoy utilizada en todos los países citrícolas con los anticuerpos monoclonales españoles 3DF1 y 3CA5 producidos y patentados en 1982 en colaboración del IVIA con la empresa española INGENASA (Madrid). Estos anticuerpos son los únicos que en mezcla, son capaces de reconocer a cualquier aislado de CTV sin reacción alguna con componentes de la planta hospedadora. La especificidad de los anticuerpos monoclonales, su gran avidez por CTV y su facilidad de comercialización por ser homogéneos y estables, ha facilitado enormemente la realización de técnicas ELISA-DAS o DASI para CTV.

También se han puesto a punto técnicas moleculares basadas en la



Foto 4. Numerosas muestras pueden ser incluidas en una membrana estandar (7 x 13 cm). En la mostrada en la foto se han utilizado brotes.

detección del ARN viral tras retro-transcripción a ADN y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa. Estas técnicas conocidas como RT-PCR son más laboriosas que las técnicas serológicas ELISA convencionales y actualmente su coste es muy superior. Su ventaja teórica es la sensibilidad, aunque se ve muy reducida cuando se aplica a extractos de material vegetal. La variante de inmunocaptura-PCR (IC-PCR) permite resolver en parte este problema, uniendo a la especificidad de la serología la sensibilidad de la PCR. Los virus previamente fijados a anticuerpos específicos son descapsidados y su ARN utilizado como diana y molde para la reacción, evitando en parte inhibidores.

Las técnicas moleculares basadas en PCR con el uso de iniciadores específicos, pueden constituir en el futuro una potente arma para diagnóstico rutinario de CTV, pero actual-

mente debido a su baja repetibilidad, complejidad y coste, quedan relegadas a su uso en laboratorios especializados. Sin embargo, tienen grandes posibilidades ya que se basan en la detección de parte del genoma viral, y recientemente, Olmos y col., han puesto a punto un método de *nested-PCR* en un único tubo cerrado, que presenta gran sensibilidad para detección de CTV.

A pesar de las ventajas de las técnicas serológicas ELISA en microplacas y de las técnicas moleculares, el gran inconveniente que poseen es la necesidad de realizar extractos. Este hecho limita las posibilidades de ambas técnicas en numerosos aspectos.

La realización de extractos, especialmente en el caso de plantas leñosas, es laboriosa y limita extraordinariamente el número de muestras que puede procesar un operario diariamente. La preparación de extractos, requiere tampones especiales y aparatos capaces de triturar y homogeneizar (homogeneizadores de vástago, rulos, bolas, molinillos, etc.) que son costosos. Durante el proceso de extracción se liberan inhibidores de origen vegetal que pueden interferir en las reacciones posteriores y existe riesgo de contaminación entre muestras, especialmente en el caso de PCR. Además, tras la recolección de las muestras en campo, estas deben mantenerse en frío (4-6°C) durante una semana como máximo. Si las muestras estuvieran en mal estado sería necesario volver a recolectarlas, implicando cuantiosos gastos.

Aunque son evidentes las ventajas de las técnicas ELISA-DAS o DASI, la detección de CTV en material vegetal es relativamente costosa, no sólo por la conservación de las muestras y la preparación de los extractos, sino también por la necesidad de aparatos especiales para la lectura de las microplacas. En el caso de PCR los equipos necesarios son tan costosos o

más que los necesarios para ELISA y se complica la lectura de resultados, pues está basada bien en tinción con bromuro de etidio tras electroforesis, o bien en una reacción final serológico-colorimétrica como en una técnica ELISA y por tanto, con problemas añadidos de coste.

Para paliar los inconvenientes derivados de la realización de extractos, se han desarrollado variantes de ELISA y de PCR que emplean material vegetal inmovilizado sobre membranas, sin necesidad de realizar trituración ni homogeneización de las muestras. En el caso de técnicas serológicas, Lin y colaboradores en 1990, describieron un procedimiento de impresión de cortes de tejidos vegetales en membranas de nitrocelulosa y su posterior revelado serológico mediante ELISA. Fue descrito como DTBIA siglas de las palabras en inglés: Direct Tissue Blot Immunossay-Assay. El método, hoy denominado “**Inmunoimpresión-ELISA**” o “**Tissue Print-Elisa**”, ha sido puesto a punto y mejorado para diferentes modelos, pero el más estudiado y con el que se posee más experiencia es con el CTV.

#### EL MÉTODO DE INMUNOIMPRESIÓN-ELISA

El método de Inmunoimpresión-ELISA para la detección del virus de la tristeza fue desarrollado entre 1991 y 1993 en el IVIA de Moncada (Valencia) por el Dr. Cambra y colaboradores y junto al equipo del Dr. Garnsey del USDA de Orlando (USA). Una vez puesto a punto y probado ampliamente en campo en 1992 y 1993, el IVIA firmó un convenio con la empresa valenciana Plant Print Diagnostics S.L. para el diseño de un estuche de diagnóstico completo. El objetivo del estuche fue el de permitir su manejo, y por tanto la detección de CTV, a personas no especializadas en

trabajos de laboratorio y hacer posible análisis rápidos y fiables en condiciones de campo. El estuche diseñado es de muy fácil uso e incluye todo lo necesario para realizar el método.

El proceso consta de cuatro etapas básicas y secuenciales. 1. Recolección e impresión de las muestras en la membrana. 2. Bloqueo de la membrana impresa y reacción. 3. Lavado y 4. Revelado y lectura de resultados.

### 1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS E IMPRESIÓN DE MEMBRANAS

Las muestras pueden ser recolectadas en cualquier época del año evitando los meses de máximo calor, períodos de parada vegetativa en los que el material vegetal está más seco y lignificado. **La época ideal en las condiciones españolas es de octubre a julio.** Realizar cortes, transversales u oblicuos, muy limpios en brotes

tiernos, pedicelo de hojas o pedúnculos de frutos desde recién cuajados.

Para realizar los cortes se deben utilizar instrumentos bien afilados. Los cortes pueden realizarse directamente en campo o en gabinete o laboratorio usando muestras previamente recolectadas y conservadas a 4°C durante máximo una semana (**foto 2**). Una vez efectuados los cortes, se presionarán las secciones de forma cuidado-



Fotos 5, 6, 7 y 8. Un equipo formado por dos personas toma muestras de hojas en vivero. Las hojas se reúnen en mazos mediante un ingenioso sistema desarrollado por Viveros Valencia. Una vez en gabinete se seccionan los pedicelos y se procede a imprimirlos en las membranas. El rendimiento del equipo permite la impresión de 3.200 plantas/día, que posteriormente serán analizadas.



Fotos 9, 10 y 11. En Viveros Alcanar, un equipo de dos personas toma muestras de hojas bajo túnel de plástico, e imprime las membranas. El método permite al mismo equipo la impresión en el terreno y el análisis de 1.250 plantas/día.



sa pero con firmeza contra la membrana de ester de celulosa o de nitrocelulosa de 0.45 m de poro, que se utiliza como inmunoabsorbente (foto 3). En la membrana quedarán las huellas, improntas o impresiones del material vegetal. Dejar secar unos minutos y conservar las membranas el tiempo que se desee en ambiente seco y al abrigo de la luz hasta su análisis, o enviarlas por correo a un laboratorio o al lugar donde se deseen

analizar. Las membranas son quebradizas y muy porosas, y por tanto, se deben tratar cuidadosamente evitando su rotura durante el transporte o su utilización en campo.

El número de impresiones que se pueden realizar por membrana lógicamente dependerá de las medidas de la misma, pero para una superficie estandar de 90-100 cm<sup>2</sup> considerado ideal (7 x 13 cm aproximadamente), se pueden incluir de 600 a 1.200 impresiones según sean de brotes o de hojas. Si se utilizan brotes el número de impresiones será menor que si se utilizan pedicelos de hojas, pero serán más fácilmente identificables y la lectura será más sencilla. En cualquier caso el número de impresiones por membrana puede de ser el máximo posible mientras la posterior localización de las muestras sea sencilla y no induzca a error.

**Para lograr un análisis fiable de árboles adultos, se ha establecido que es necesario recolectar 5 brotes de 10-15 cm del material más joven que exista. Se tomarán alrededor del árbol, preferiblemente de la parte mediana-alta de la copa ya**

**que es la zona con mayor probabilidad de ser visitada por pulgones. Realizar 2 impresiones por brote cortando de su base y de la parte más apical, así se realizarán 10 impresiones por árbol adulto. Si en vez de tomar brotes, se prefiere recolectar hojas, se deberán analizar 10 hojas de la parte media-alta del árbol y tomadas a su alrededor. Se realizará 1 impresión por hoja tras seccionar la zona del pedicelo.**

En el caso de grandes prospecciones para establecer el porcentaje aproximado de infección, se puede reducir el número de muestras/árbol a 3 brotes o bien 6 hojas. Se realizarán 2 impresiones por brote o una por pedicelo de hoja. No obstante, si la finalidad es erradicación o el control de plantas madre de viveros, será conveniente respetar el número de 5 brotes o 10 hojas, o incluso aumentarlo.

El control de patrones y plantones de vivero, se logra con fiabilidad tomando 2 brotes/plantón o 4 hojas/plantón y siguiendo la norma de 2 impresiones/brote o 1 impresión/pedicelo de hoja (fotos 5 a 11). En el caso de tratarse de plantas

madre de yemas, como estas poseen numerosos brotes, sería conveniente aumentar el muestreo ya que existe mayor probabilidad de infección. En todo caso, la total certeza se puede obtener analizando cada brote en su parte basal y apical. El análisis de dicho brote garantizará para todas las yemas del mismo, la ausencia de CTV. Ello pudiera ser útil en casos de exportación de yemas en los que se requiriera un certificado individual. El sistema está muy indicado para establecer nuevos campos de pies madre o material de base.

El porcentaje de plantas a muestrear dependerá en cada caso del objetivo final del análisis. En casos de exportación o de importación, el análisis de plantas debería ser individual así como en el control de las plantas madre de los viveros o de los árboles de base. En estos últimos casos se deberían realizar análisis anuales, antes de la aparición de los primeros vuelos de pulgones (mes de mayo en España). El control de la producción de un vivero, ya sea de patrones o de plántones ya injertados, puede efectuarse analizando al azar el 1% de las plantas producidas (fotos 9, 10 y 11). Caso de detectarse CTV podría realizarse una depuración analizándose individualmente todas las plantas. Es aconsejable realizar análisis en las plantas que más fácilmente se infectan, ello dará una idea de la infección natural existente. Los patrones que se infectan más frecuentemente por pulgones virulíferos en España son: *C. macrophylla* y el mandarino Cleopatra, y las especies y variedades más fácilmente infectadas de forma natural han resultado ser, en orden de mayor a menor: clementinas y mandarinos, naranjo dulce, pomelo y limonero. Este último se infecta únicamente de forma ocasional en las condiciones españolas. Por todo ello, si se desea buscar CTV en vivero, deberían analizarse en primer lugar las especies de clementina injertadas



Foto 12. Lavado de membranas en condiciones de campo.

sobre *C. macrophylla* o sobre Cleopatra. Si en ellas no se encuentra CTV, es un buen índice de que probablemente no han ocurrido muchas infecciones naturales en el vivero.

Si se desea analizar limoneros injertados sobre *C. macrophylla*, la muestra se deberá tomar únicamente del patrón o de sus rebrotes. Una estrategia adecuada sería el análisis de *C. macrophylla* antes de ser injertado.

## 2. BLOQUEO DE LA MEMBRANA IMPRESA Y REACCIÓN

Las membranas impresas pueden ser reveladas inmediatamente después de la impresión de las muestras o meses después, si han sido conservadas en obscuridad y un lugar seco incluso a temperatura ambiente. La primera operación consiste en bloquear los poros de la membrana y la superficie no impresionada con una solución del 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en agua destilada. Las membranas deben permanecer a temperatura ambiente en la solución bloqueadora durante 1 hora al menos, o durante unas 16 horas si la operación se realiza a 4°C. Para efectuar la operación, colocar la solución de albúmina y las membranas en un recipiente apropiado, con base de superficie

ligeramente superior al tamaño de las membranas. Es necesario que las membranas queden perfectamente mojadas y cubiertas con la solución bloqueadora. Una ligera agitación es beneficiosa aunque no necesaria.

Una vez bloqueadas las membranas, se desechará la solución de albúmina y se mantendrán las membranas en el mismo recipiente. La albúmina sobrante puede ser reutilizada una vez más, mientras se conserve a 4°C durante al máximo 1-2 días y no se observe contaminación (suele traducirse en turbidez).

Sobre las membranas húmedas de solución de albúmina, se añadirá una solución de anticuerpos monoclonales (3DF1+3CA5) específicos de CTV, marcados con la enzima fosfatasa alcalina. La dosis ideal es de 0,1 mg/ml de inmunoglobulinas en agua fisiológica tamponada pH 7,2-7,4. Si se utilizan anticuerpos policlonales, la dosis puede ser muy diferente en función de la especificidad de los anticuerpos y de la calidad del conjugado. Se incubará cubriendo bien las membranas con la solución durante 2 ó 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo de reacción, se desechará la solución de anticuerpos conjugados. No obstante, esta



Foto 13. Cuatro pedicelos de hojas (subrayados en rojo) muestran acúmulos en la zona vascular tras el revelado de la reacción de inmunoprecipitación directa-ELISA. El resto son negativos. Foto x6.

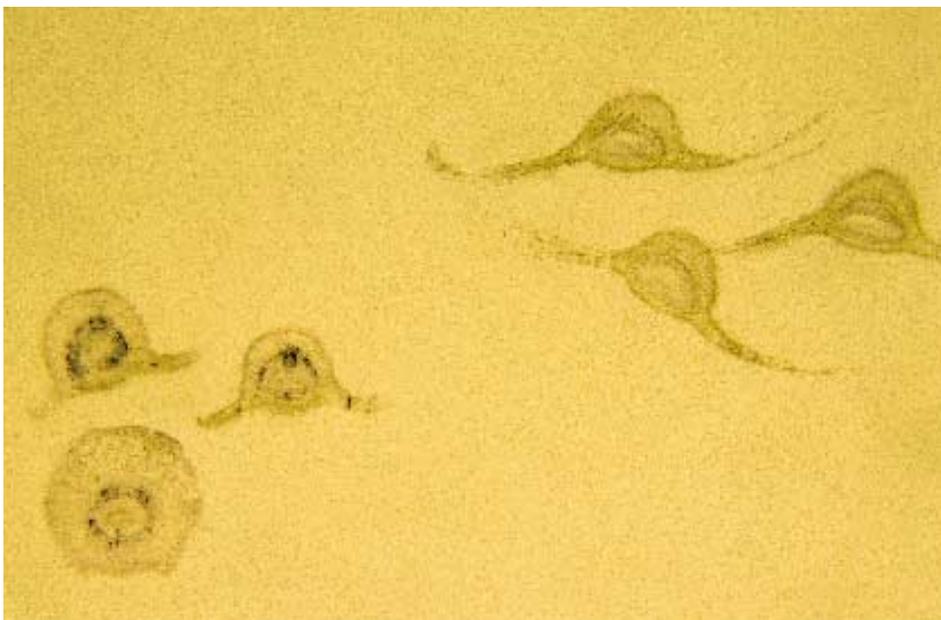


Foto 14. Precipitados de sustrato en la zona vascular del pedicelo de las hojas inferiores. Las superiores no aparecen infectadas por CTV.

solución puede ser reciclada, especialmente si se emplean anticuerpos monoclonales. Para ello, conservar la solución a 4°C durante un máximo de 1 ó 2 días y utilizarla de nuevo si no se observa contaminación en la misma. Esta solución reciclada puede servir, mezclada con una de reciente preparación, para aumentar el número de membranas de un análisis y por tanto reducir costes.

Las operaciones de reciclado deben efectuarse cuidadosamente, pues conllevan riesgos. Suele ser preferible aumentar el número de muestras impresas o el número de membranas por análisis si se desea reducir costes y evitar riesgos.

**Se ha logrado recientemente en el IVIA, por medio de ingeniería genética el clonado de los genes de ratón que producen los anticuerpos mono-**

**clonales 3DF1 y 3CA5 específicos de CTV y su expresión en bacterias.** En colaboración con el grupo de los Drs. Himmler y Kerschbaumer del IAM de Viena, se han expresado fragmentos (scFv) de los anticuerpos mencionados con fosfatasa alcalina como producto de fusión. Así, se han obtenido anticuerpos recombinantes artificiales, capaces de reconocer al CTV y simultáneamente portar la enzima fosfatasa alcalina. Este importante logro biotecnológico, permitirá abaratar a medio plazo el costoso método de la conjugación con la enzima por medio del glutaraldehído y la producción de anticuerpos. Los fragmentos con fosfatasa alcalina como producto de fusión (scFv-APS) obtenidos son funcionales contra CTV y permiten su uso rutinario con la misma sensibilidad, especificidad y capacidad de detección que los anticuerpos monoclonales originales, abriendo nuevas posibilidades en la detección y el control de CTV.

Durante el proceso de adición e incubación de los anticuerpos (convencionales o recombinantes) conjugados con fosfatasa alcalina, estos reaccionarán contra el CTV contenido en la sección del tejido vegetal impreso en la membrana. Allí donde se fijen los anticuerpos conjugados habrá presencia de la enzima, que es la clave para el desarrollo del método en sus fases posteriores en las que se pretende visualizar la presencia del virus.

### 3. LAVADO DE MEMBRANAS

El recipiente y las membranas se enjuagarán y serán posteriormente lavadas con tampón lavador (agua fisiológica tamponada con Tween-20 como agente mojante). La etapa de lavado es esencial ya que permite eliminar todos los anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina que no hayan reaccionado (**Foto 12**). Así únicamente quedarán trazas de enzima sobre las secciones de material vegetal impreso que estuviera infectado por CTV. En el recipiente,

superficie no impresa de las membranas, poros de las mismas y en las muestras libres de CTV, se habrá eliminado la enzima fosfatasa alcalina.

La operación de lavado es conveniente realizarla con agitación, que se puede lograr mecánica o manualmente, y además debe utilizarse abundante volumen de tampón lavador (aproximadamente 1 litro por cada 10-15 membranas estándar de 7 x 13 cm).

#### 4. REVELADO Y LECTURA DE RESULTADOS

La presencia de anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina exclusivamente en las secciones de material vegetal infectado, puede ser fácilmente puesta de manifiesto añadiendo un sustrato específico de la enzima. Entre los posibles, el sustrato precipitante con nitroblue de tetrazolio y bro-

mo cloro indolil fosfato (NBT+BCIP), presenta las ventajas de su facilidad de manejo y de una buena sensibilidad. La posibilidad de preparar el sustrato con pastillas disueltas en agua, ha facilitado enormemente el uso a personal no especializado.

El sustrato se añadirá sobre las membranas cubriéndolas ligeramente y se dejará incubar a temperatura ambiente hasta la aparición de precipitados de color violeta-púrpura. Estos se acumularán en la zona vascular de las secciones del material vegetal impreso. Los precipitados aparecerán tras unos 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. El revelado puede ser paralizado lavando las membranas con agua corriente.

La lectura de las membranas se puede realizar estando todavía húmedas o bien cuando ya están secas. En

muchos casos una lectura a simple vista es suficiente, pero deben ser observadas con ayuda de una lupa binocular x10 ó x20 aumentos. La presencia de unos pocos precipitados en la zona del floema es suficiente para concluir que el material vegetal está infectado (véanse Fotos 13 a 17).

#### FIABILIDAD Y VENTAJAS DE LA INMUNOIMPRESIÓN-ELISA

El método de inmunopresión-ELISA es actualmente el más sencillo, rápido, económico, sensible y fiable para la detección rutinaria de CTV. En la **tabla 1**, se compara con otras técnicas de detección de CTV en diversos aspectos.

En efecto, mediante inmunopresión se puede recolectar una muestra en campo, imprimirla en membrana y



Foto 15. Acúmulos de CTV en los testigos positivos incluidos en el estuche comercial de inmunopresión-ELISA. Se aprecian precipitados en la zona vascular de los brotes. Foto x10.

revelar la reacción en 3 horas. Las otras técnicas que utilizan extractos, precisan su preparación que conlleva al menos 24 horas tras la recolección de la muestra (total 2 días).

El coste de recolección de las muestras es similar para cualquier sistema y se evalúa para plantas de vivero en unas 13'60 pta./planta considerando un equipo de dos personas. El coste final del análisis incluye la recolección y preparación de la muestra, el coste del material y reactivos para el análisis y la amortización del equipo, y supone 40 pta. para inmunopresión-ELISA, casi el triple para ELISA convencional con extractos y más del quintuple para PCR.

El número de plantas de vivero que puede imprimir un equipo de dos personas (muestras ya recolectadas) es de 3.200 plantas/día mediante inmunopresión, muy superior al que se puede analizar cuando se preparan extractos y hay que dispensarlos en microplacas o tubos.

La realización de la técnica de inmunopresión-ELISA no tiene riesgos de contaminación y su repetibilidad es muy buena. Todo ello le confiere una excelente fiabilidad.

La sensibilidad teórica de las técnicas moleculares como PCR es muy elevada, pero en análisis rutinario de plantas de campo su sensibilidad es similar a la de inmunopresión-ELISA. En efecto, el análisis rutinario de 65 árboles adultos mediante IC-PCR y mediante inmunopresión, utilizando el mismo material vegetal, dió como resultado final que la técnica de inmunopresión es tan sensible como IC-PCR. Las muestras discordantes fueron analizadas mediante inoculación de limas mexicanas, ELISA-DAS, inmunopresión-ELISA e IC-PCR, mostrando que la técnica de inmunopresión era la más fiable.

La inmunopresión-ELISA, al no requerir extractos, permite la detección de antígenos nativos y dianas sin modificaciones. Ello tiene importancia

**TABLA 1. COMPARACIÓN DE LA INMUNOPRESIÓN-ELISA, CON OTRAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS.**

	ELISA-DAS (extractos)	Inmunopresión-ELISA	Inmuncaptura-PCR (extractos)
<b>SENSIBILIDAD REAL</b>	++	+++	+++
<b>RAPIDEZ</b>	24 h.	3 h.	24 h.
<b>COSTE/ANÁLISIS</b> (material y reactivos)	75 pta.	26 pta.	180 pta.
<b>INVERSION NECESARIA</b> (millones ptas.)	2,5	0-0,2	2,0
<b>PREPARACIÓN MUESTRAS</b>	Trituración-homogeneización	Impresión	Trituración-homogeneización
<b>COSTE EXTRACCIÓN/MUESTRA</b>	14 pta.	0 pta.	14 pta.
<b>CAPACIDAD DE ANÁLISIS (PLANTAS/DÍA) POR EQUIPO DE 2 PERSONAS</b> (incluyendo preparación de muestras ya recolectadas).	600	3.200	150
<b>SENCILLEZ</b>	++	+++	+
<b>REPETIBILIDAD-FIABILIDAD</b>	+++	+++	++
<b>NECESIDAD PERSONAL ESPECIALIZADO</b>	SI	NO	SI
<b>CAPACIDAD USO EN CAMPO</b>	NO	SI	NO
<b>POSIBILIDAD DE AGRUPAR MUESTRAS</b>	SI	NO	SI
<b>RIESGO CONTAMINACIONES</b>	++	-	+++
<b>COSTE TOTAL ANÁLISIS INCLUYENDO RECOLECCIÓN MUESTRAS, EXTRACCIÓN o IMPRESIÓN, REACTIVOS y MATERIAL y AMORTIZACIÓN.</b>	105 pta.	40 pta.	210 pta.

cuando se trata de observar la reacción frente al anticuerpo monoclonal MCA13. Analizados mediante ELISA-DASI (con extractos) 415 muestras de campo positivas con los anticuerpos 3DF1+3CA5, 161 reaccionaron con MCA13. Cuando los mismos materiales fueron analizados por inmunopresión-ELISA, 226 proporcionaron reacción positiva frente al MCA13. Ello indica que la inmunopresión es más sensible que ELISA con extractos, y muestra cómo los extractos pueden modificar algunos epítomos hasta hacerlos no reconocibles.

**Las ventajas de la inmunopresión-ELISA para la detección del virus de la tristeza son tan evidentes, que a medio plazo desplazará a la técnica ELISA convencional.** Desde la disponibilidad comercial de un estuche completo para realizar aná-

lisis de CTV, el diagnóstico del virus se ha popularizado y la práctica totalidad de viveristas españoles utilizan el sistema. Con ello, se garantiza la ausencia de tristeza en los plantones producidos bajo un programa de certificación. Se han analizado desde 1994 por parte de los propios viveristas más de un millón de plantas, la inmensa mayoría de ellas en España, aunque el método del IVIA ha sido adoptado en los principales países citrícolas para realización de prospecciones y controles en plantaciones adultas y viveros.

**La técnica de la inmunopresión directa-ELISA ha revolucionado el concepto del diagnóstico del virus de la tristeza, permitiendo que personal no experto en laboratorio, pueda efectuar de forma sencilla y económica, miles de análisis con alta sensibilidad y fiabilidad.**



Foto 16. La lectura de membranas puede realizarse a simple vista o con ayuda de una lupa sencilla o binocular x5 ó x10 aumentos. En la foto x5 aumentos, se aprecian los positivos (secciones teñidas de color violeta-púrpura).

### AGRADECIMIENTOS

El desarrollo del sistema de inmunoprecipitación-ELISA ha sido financiado mediante un convenio suscrito por el IVIA con la empresa Plant Print Diagnostics S.L. y ensayado en campo con financiación INIA (SC94-035 y SC98-060).

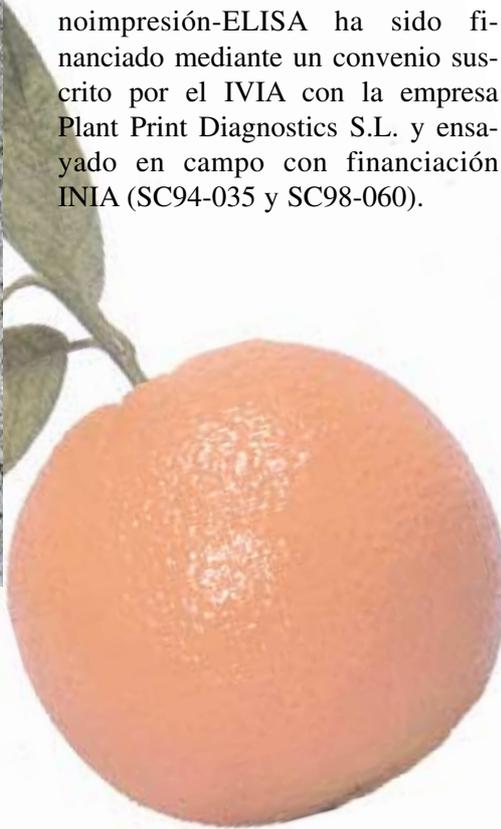


Foto 17. Precipitados de CTV en zona vascular de una reacción de brote tras ser revelados con anticuerpos recombinantes (scFv) fusionados a fosfatasa alcalina. Foto x20.

### Bibliografía

- CAMBRA, M., GORRIS, M.T., CAMARASA, E., ASENSIO, M., 1991. Detección y localización del virus de la tristeza (CTV) y del virus de la sharka (PPV) mediante inmunoprecipitación directa-ELISA. In: III Reunión Científica de la Soc. Esp. de Fitopatología. Ed. SEF, Diputación General de Aragón. Zaragoza, 55.
- CAMBRA, M., CAMARASA, E., GORRIS, M.T., ROMÁN, M.P., ASENSIO, M., PÉREZ, E., SERRA, J., CAMBRA, M.A. 1995. Detección de proteínas estructurales de virus mediante inmunoprecipitación-ELISA y su uso en diagnóstico. Investigación Agraria. Fuera de serie Nº 2, 221-230.
- CAMBRA, M., OLMOS, A., GORRIS, M.T., DURAN, N., ROMÁN, M.P., CAMARASA, E., DASÍ, M.A. 1997. Sensitive detection of plant pathogens by using immobilized targets in tissue imprinted membranes. 95-98. In: Diagnosis and identification of plant pathogens. Eds: H.W. Denhe, G. Adam, M. Diekmann, J. Frahm, A. Mauler-Machnik, P. van Halteren. Kluwer Academic Publishers. London, 556 pp.
- GARNSEY, S.M., PERMAR, T.A., CAMBRA, M., HENDERSON, C.T., 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). In: Proc. 12th conf. IOCV, ed. IOCV, Riverside, 39-50.
- LIN, N.S., HSU, H.Y., SU, H.T., 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. Phytopathology 80: 824-828.
- OLMOS, A., CAMBRA, M., ESTEBAN, O., GORRIS, M.T., TERRADA, E., 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single close-tube. Nucleic Acids Research 27, 1564 - 1565.
- VELA, C., CAMBRA, M., CORTÉS, E., MORENO, P., MIGUET, J.G., PÉREZ DE SAN ROMÁN, C., SANZ, A., 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis. Journal of General Virology 67: 91-96.

### AVISO

En la sección de VIDEOTECA se ofrece un vídeo sobre la producción de anticuerpos monoclonales, que tiene relación con este artículo.