

Diagnóstico del virus X de la papa mediante el sistema ultramicroELISA

D. RIVAS, M. PUJOL y S. PÉREZ

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba.

Recibido en mayo de 1989

Aprobado en junio de 1989

RESUMEN

El cultivo de la papa se ve afectado grandemente por las infecciones virales, principalmente PVX, PVY y PLRV, por lo que se requiere un sistema de diagnóstico capaz de procesar un gran número de muestras de una forma rápida y confiable que satisfaga las exigencias fitosanitarias, sobre todo para la producción de semilla agrícola libre de virus y en el trabajo de cuarentena.

Nuestro trabajo se basó en adaptar el sistema ultramicroELISA, usado en Cuba para el diagnóstico clínico de forma masiva, para la detección de virosis vegetales.

Se comparan los sistemas ultramicroELISA y microELISA para el diagnóstico del PVX respecto a sensibilidad y confiabilidad. Para la determinación se usaron diferentes sustratos para sistemas colorimétricos y fluorimétricos.

SUMMARY

Virus infections on potato crops are a serious problem over the world, mainly PVX, PVY and PLRV, demanding diagnostic systems directed to screen a large amount of samples in a short period of time in order to produce virus-free seeds.

UltramicroELISA is an ELISA-derived system of diagnosis developed in Cuba which is nowadays widely used in mass clinic diagnosis all over the country.

We have adapted this system for the detection of PVX in potato crops. Sensitivity and reliability are compared between microELISA and ultramicroELISA. This new system maintains equal or better parameters, consumes 1/10 of the reagents and can be automatized easily.

INTRODUCCION

La técnica ELISA fue usada por primera vez para la detección de virus de plantas en los trabajos de Clark y Adams (1977), después de lo cual esta técnica ha sido adoptada en la mayoría de los laboratorios y centros de producción de semilla libre de virus como forma fundamental de diagnóstico.

En los últimos años se ha desarrollado en el Centro de Inmunoensayo de Cuba una nueva variante de ELISA: el ultramicroELISA. Este sistema se está usando en el

diagnóstico de enfermedades humanas (Horn *et al.*, 1981; Otero *et al.*, 1984; Van Brunt, 1987). En nuestro trabajo nos proponemos demostrar el uso de este sistema ultramicroanalítico (SUMA) como una variante del ELISA con mejores perspectivas que el microELISA usado hasta el momento en nuestros laboratorios como técnica de rutina. Para esto realizamos su introducción en el diagnóstico del virus X de la papa (PVX).

Este virus se encuentra comúnmente en el cultivo de la papa en todo el mundo, causando pérdidas entre el 5 y el 15% en el rendimiento de la cosecha (Berks, 1970; Koenig y Laseman, 1978). Su diagnóstico por los síntomas visuales en el follaje no es confiable por lo que usualmente se realiza serológicamente, sobre todo en esquemas de certificación de semillas, programas de mejoramiento genético y trabajos de cuarentena (Fribourg, 1978; Jones *et al.*, 1981), en los cuales el sistema que describimos en este trabajo puede resultar de gran utilidad.

MATERIALES Y METODOS

Purificación del virus

La purificación del virus se realizó a partir de plantas de *Nicotiana tabacum* c.v Xanthi (Huttinga y Maat, 1987) inoculadas con un aislado de PVX cedido por el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Las plantas fueron inoculadas mecánicamente, utilizando un macerado de hojas enfermas diluido 1:10 en tampón fosfato, el cual contenía carborundo como abrasivo.

El material vegetal se cosechó a los 30 días posteriores a la inoculación (Cambrey *et al.*, 1981). La purificación del virus fue realizada mediante maceración en tampón fosfato 0,2 % β -mercaptoetanol y precipitación en polietilenglicol y cloruro de sodio (Huttinga y Maat, 1987). Los contaminantes finales fueron eliminados a través de gradientes discontinuos de sacarosa 10-40 %.

La calidad del material obtenido fue chequeada en electroforesis de poliacrilamida-SDS 12,5 % (Hill y Shepherd, 1972). El virus obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro Hitachi a una D.O. de 280 nm.

Producción, purificación y conjugación de anticuerpos anti-PVX

Para la producción de antisuero se siguió un esquema de inoculación en conejo que consistió en una dosis inicial de 1,0 mg de virus, diluido en 1 ml de adyuvante completo de Freund, cuatro dosis subsiguientes de 0,5 mg de adyuvante incompleto de Freund a intervalos semanales. Después de pasados 15 días el animal fue inyectado con 0,5 mg de virus sin adyuvante.

Para la purificación del antisuero se siguió el método descrito por Clark y Adams (1977), usando una columna DE-52 (Pharmacia), para obtener mayor pureza, la cual fue chequeada en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5 %.

Las inmunoglobulinas purificadas mostraron ser específicas para su antígeno, al no reconocer al virus Y y al del enrollamiento de la hoja de papa en plantas infectadas con estos virus.

Los anticuerpos fueron conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma, tipo VII-S) usando como puente glutaraldehído al 0,06 % según Clark y Adams, 1977.

Montaje general del ELISA

Se siguió un sistema tipo *sandwich* directo utilizando anticuerpos homólogos y concentraciones para el recubrimiento desde 0,23 μ g/ml hasta 1,4 μ g/ml en solución fijadora de Na_2CO_3 y NaHCO_3 pH 9,6 durante 2 h a 37°C.

Se realizó el lavado de las placas con PBS-Tween seguido de un bloqueo con BSA al 0,1 % en PBS-Tween durante 1 h a temperatura ambiente; después los pocillos se llenaron con savia de plantas sanas y enfermas diluidas en PBS-Tween-polivinilpirrolidona a una relación de 1:10 peso/volumen, y se incubaron a 37°C durante 2 h. Más tarde se efectuó el lavado y se adicionó el conjugado, en diluciones desde 1:1000 hasta 1:6000 en PBS-Tween-polivinilpirrolidona con 0,2 % de BSA, incubando durante 2 h a 37°C. A continuación se realizó el lavado de la placa y se adicionó el sustrato: p-nitrofenilfosfato o

umbeliferil fosfato, en dependencia de cuál sistema se trabaje (microELISA o ultramicroELISA), y se incubó a temperatura ambiente durante 30-60 minutos.

Montaje del sistema microELISA

Se utilizaron placas de microtitulación Greiner adicionando en los pocillos 100 μ l en cada paso, excepto en el conjugado, donde se aplicaron 80 μ l.

Se utilizó como sustrato el p-nitrofenilfosfato (Boeringer) a una concentración de 0,6 mg/ml en tampón dietanolamina al 9,7 % pH 9,8 incubando las placas durante 30-60 min a temperatura ambiente, después de lo cual se realizó la medición de 405 nm en un lector de placas de microtitulación Multiskan.

Montaje del sistema ultramicroELISA

Se utilizaron placas UME de cloruro de polivinilo con 96 pocillos, en las cuales se adicionaron en todos los pasos 10 μ l de solución excepto para el conjugado donde se aplicaron 8 μ l, utilizando una multipipeta automática de 96 canales.

Se utilizó como sustrato de la enzima el 4-metil umbeliferil fosfato a una concentración de 0,13 mg/ml en buffer dietanolamina.

Las placas se incubaron de 30-60 min; posteriormente la solución de cada pocillo se transfirió mediante la multipipeta automática a una placa de vidrio sobre la cual se realizó la lectura en un lector computarizado SUMA, que puede ser programado para el cálculo de sensibilidad y correlación de las diferencias entre las muestras y los controles.

RESULTADOS

Se construyó una curva con los valores obtenidos al variar las concentraciones de IgG en el recubrimiento, para ambos sistemas, obteniéndose una concentración óptima de 1,2 μ g/ml para el sistema microELISA y de 0,4 μ g/ml para el ultramicroELISA (figura 1).

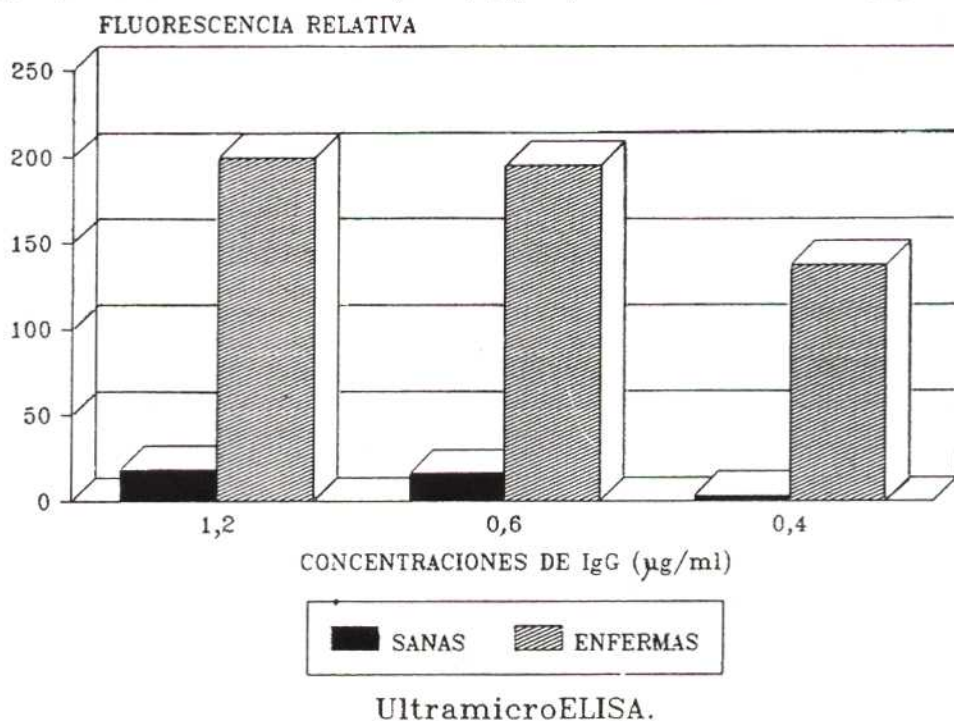


FIG. 1. Ajuste de la concentración óptima de anticuerpos para el recubrimiento en el sistema microELISA.

Cuando no se realiza bloqueo con BSA en el ultramicroELISA, se obtiene una marcada caída de la resolución, determinada por la poca discriminación entre las lecturas para muestras sanas y enfermas, mientras que el efecto del bloqueo es insignificante en el sistema microELISA.

Un problema similar, pero de menor dimensión ocurre cuando se elimina el BSA 0,1 % del buffer PBS-Tween-polivinilpirrolidona en las diluciones del conjugado, siendo casi imperceptible la variación que ocurre en el sistema microELISA ante el mismo efecto.

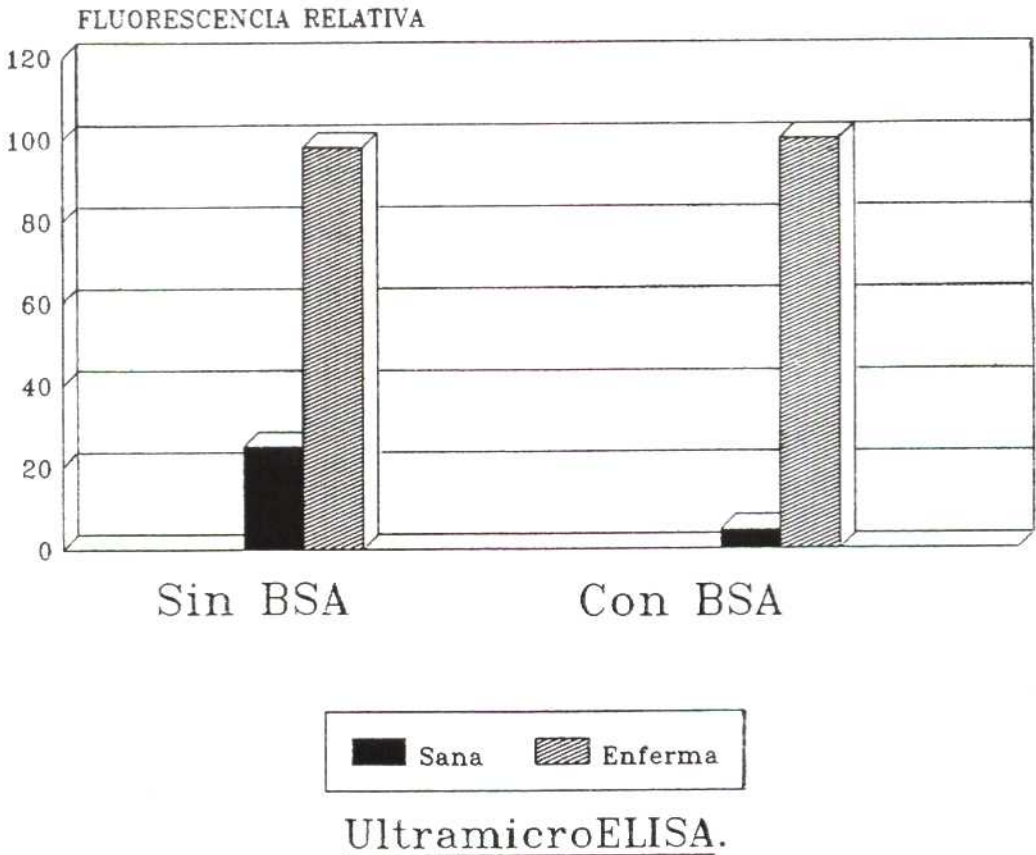


FIG. 2. Efecto del BSA al 0,1 % en el buffer de dilución del conjugado para el sistema ultramicroELISA.

Se realizaron experimentos de variación de la dilución del conjugado para ambos sistemas, cuyos resultados se aprecian en las figuras 3a y 3b, tomando como valor óptimo la dilución 1:1000 para el micro y 1:2000 para el ultramicroELISA, los cuales fueron seleccionados por obtenerse con estas diluciones los menores valores de lecturas para los controles sanos y valores de lecturas para los controles positivos de aproximadamente la mitad de la escala.

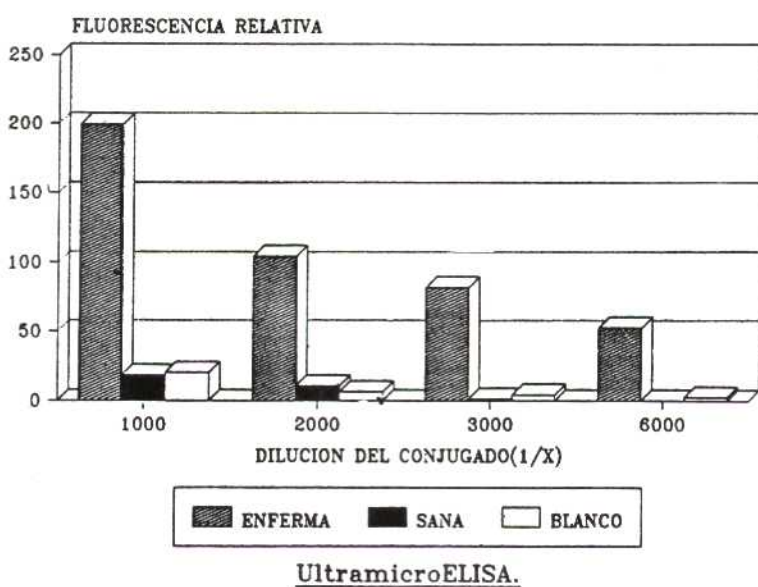
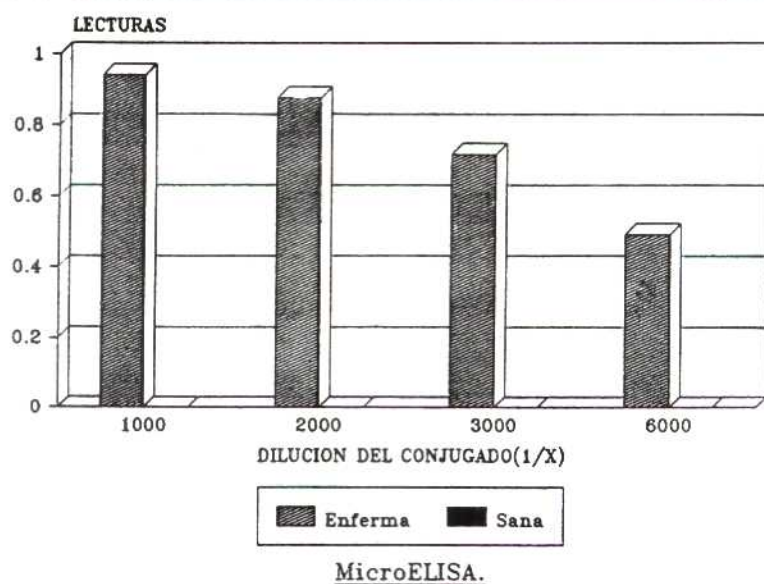


FIG. 3a. Ajuste de la dilución óptima del conjugado en el sistema microELISA para una concentración de recubrimiento en 1,2 $\mu\text{g/ml}$.

FIG. 3b. Ajuste de la dilución óptima del conjugado en el sistema ultramicroELISA para una concentración de recubrimiento de 0,4 $\mu\text{g/ml}$.

Para la comparación en cuanto a sensibilidad entre ambos sistemas, se llevó a cabo la dilución de savia de plantas enfermas en volúmenes de savia de plantas sanas, con la intención de simular plantas con cantidades decrecientes de partículas

virales. Los resultados para ambos sistemas aparecen expresados en las figuras 4a y 4b. En estas figuras se muestra que el sistema ultramicroELISA, usando mayores diluciones de los reactivos para el recubrimiento y en el conjugado, detecta el virus X de la papa en cantidades comparables a las detectadas por el sistema microELISA.

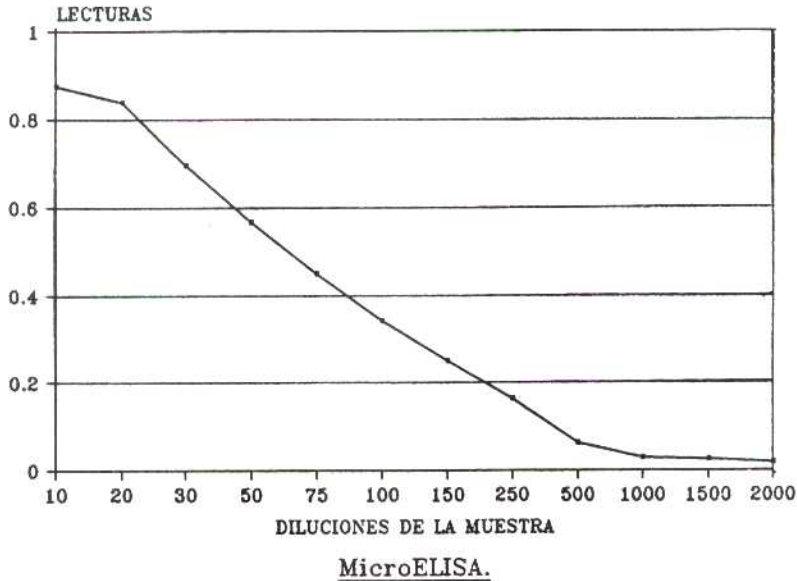


Fig.4a

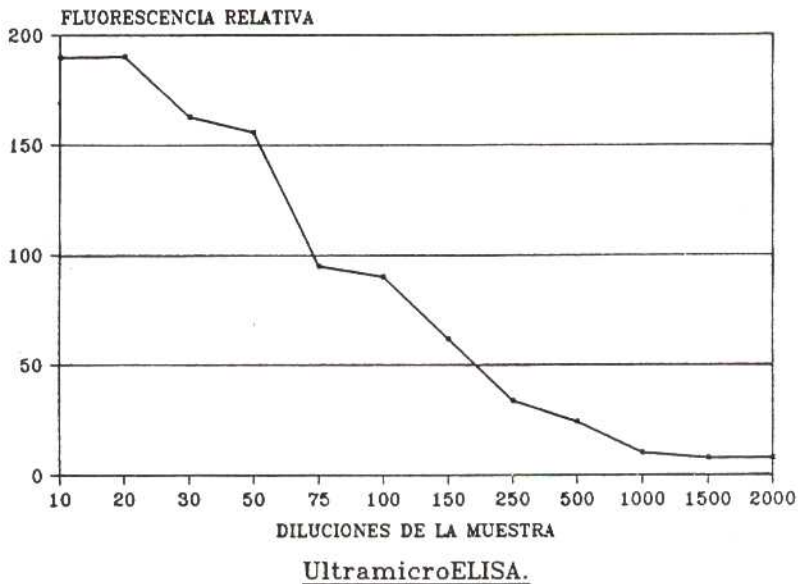


Fig.4b

FIG. 4a. Curva de sensibilidad para el sistema microELISA con una concentración de IgG en el recubrimiento de 1,2 $\mu\text{g/ml}$ y una dilución del conjugado de 1/1000.

FIG. 4b. Curva de sensibilidad para el sistema ultramicroELISA con una concentración de IgG en el recubrimiento de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ y una dilución del conjugado de 1/1000.

DISCUSION

Según nuestros resultados, el sistema ultramicroELISA ofrece ventajas respecto a la cantidad de IgG necesaria para el recubrimiento, pues no solo el volumen necesario es la décima parte, sino que puede usarse una concentración tres veces menor, de manera que con la misma cantidad de antisuero se diagnostican 30 veces más muestras que con el sistema microELISA.

Respecto a la cantidad de conjugado el ultramicroELISA también ofrece ventajas, pues permite con la misma cantidad hace 20 veces más determinaciones.

Por otra parte, los gráficos 4a y 4b demuestran que el experimento simulando plantas con cantidades decrecientes de virus arroja una sensibilidad similar para ambos sistemas.

A las ventajas anteriormente descritas hay que agregar que el equipo SUMA en el cual se efectúan las lecturas cuenta con una multipipeta automática que realiza de forma rápida y confiable las aplicaciones de todo el proceso, así como el lavado de las placas. También está provisto de un lector computarizado que lleva a cabo el procesamiento de los datos obtenidos de las lecturas.

Una desventaja de la técnica ultramicroELISA desarrollada por nosotros es la necesidad de bloqueo, lo que constituye un paso adicional en la manipulación, aunque no tiene gran repercusión en el costo del diagnóstico porque se usa en ínfimas cantidades. Actualmente se estudia la sustitución de este por otros agentes bloqueantes más comunes.

La limitación fundamental del sistema ultramicroELISA consiste en la imposibilidad de la observación visual de los resultados sobre la placa, lo que obliga al uso del equipo anteriormente mencionado, sin embargo, para centros dedicados a la producción de semilla libre de virus, ya sea por técnicas *in vitro* como tradicionales, en los cuales el número de muestras es alto y no es posible confiar en dicha forma de determinación, esta constituye una variante muy atrayente.

REFERENCIA

- BERCKS, R. (1970). *Potato Virus X. CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses* 3: 4.
- CAMBREZY, C.; H. AUGIER DE MONTGREIMER y N. LAROQUE (1981). *Pomme de Terre France* 407: 334-341.
- CLARK, M.F. y E. N. ADAMS (1977). *Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses*. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- DE BOKX, J.A. (1987). "Biological properties". En: *Viruses of potato and seed potato production*. Segunda edición. De Bokx, J.A., and J.P.H. van der Wants. (Eds). Wageningen, The Netherlands. p. 229.
- FRIBOURG, C. (1978). *Antiserum production and present status for viruses in the International Potato Seed Program. Proceedings, planning conference on developments in the control of potato virus diseases*. Internatonal Potato Center. Lima, Perú.
- HILL, J.H. y R.J. SHEPHERD (1972). *Molecular weights of plant coat proteins by polyacrylamide gel electrophoresis*. *Virology* 47: 817-822.
- HORN, A.; J.L. FERNANDEZ y M. SHULSE (1981). *UltramicroELISA for alphafetoprotein with chambers analytical technique*. *Journal of clinical chemistry and analytical biochemistry* 19: 702.
- HUTTINGA, H. y D. Z. MAAT (1987). "Purification" En: *Viruses of potato and seed potato production*. Segunda edición. De Bokx, J.A., and J.P.H. van der Wants. (Eds). Wageningen, The Netherlands. p. 259.
- JONES, R.A.C.; C.E. FRIBOURG y S.A. SLACK (1981). "Potato virus and virus like diseases". En: *Plant Virus Slide Series, Set 2*. Editado por O.W. Barnett y S.A. Tollin. South Carolina, Clemson University.
- KOENING, R. y D.E. LASEMANN (1978). *Potexviruses Group. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*. N 200, p. 5.
- OTERO, A.J.; J.SARRACENT; J.L. FERNANDEZ YERO e I. RODRIGUEZ (1984). *A 10 µl indirect ultramicroELISA for detection of monoclonal antibodies against human alphafetoprotein*. *Hybridoma*. 3: 391.
- VAN BRUNT, J. (1987). *Cuba focuses on monoclonal antibodies for human care*. *Biotechnology* 5: 1262.