



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO



ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO ELISA,
EN EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS FITOPATÓGENOS

AUTOR: ERICK RAMIREZ
TUTOR: PROF. SANDRA PLANCHART

VALENCIA, MAYO 2013.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO



CONSTANCIA DE APROBACIÓN

Los suscritos miembros del jurado designado para examinar el Trabajo Monográfico titulado: **ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO ELISA, EN EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS FITOPATÓGENOS**, presentado el bachiller: Erick Ramírez titular de la cédula de identidad No. 17.643.417, hacemos constar que hemos examinado y aprobado el mismo, en virtud de que encontramos cumple con los requisitos exigidos, correcto en su calidad y forma de presentación.

Fecha: _____

Profesor

Profesor

Profesor



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO



ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO ELISA,
EN EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS FITOPATÓGENOS

AUTOR: ERICK RAMIREZ
TUTOR: PROF. SANDRA PRANCHART
Año: 2013.

RESUMEN

Los virus fitopatógenos son agentes infecciosos causantes de enfermedades en plantas produciendo en su mayoría alteraciones del crecimiento y/o síntomas cloróticos; poseen el potencial de destruir cosechas enteras y aún en los casos en que no causan pérdidas totales, reducen la productividad o el rendimiento de los cultivos, lo que aumenta los costos de producción, afectando la calidad y durabilidad de los productos cosechados. Para poderse implementar medidas de prevención y control debe identificarse el agente causal. De aquí que en este estudio se presenta el diagnóstico de virus fitopatógenos con detalle en el ELISA, con el fin de contribuir a su divulgación en aras de apoyar su empleo en el área agrícola. El ensayo inmunoenzimático ELISA, es un método diagnóstico donde la reacción antígeno-anticuerpo es detectada indirectamente por la unión enzima-sustrato cromógeno. Enzima que está conjugada con un anticuerpo el cual producido artificialmente, monoclonal o policlonal, será específico para reconocer a una partícula viral determinada, la cual se encontrará en las muestras de extractos de tejidos vegetales en estudio. Se han desarrollado variantes del método ELISA: Elisa directo, indirecto, sándwich y sándwich indirecto, siendo el más frecuentemente empleado Elisa Sándwich, ofreciendo mayor sensibilidad y especificidad, esta técnica no sólo identifica el agente sino que permite ubicar la infección, es versátil, de fácil ejecución, rápido, puede procesar amplio número y tipo de muestras simultáneamente, posibilita el control fitosanitario de los cultivos previo y posterior a la siembra, así como certifica la calidad del material de propagación, libres de patógenos.

Palabras Claves: ELISA, Virus fitopatógenos, Métodos diagnósticos.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO



**ELISA, ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY,
IN THE PHYTOPATHOGENIC DIAGNOSIS VIRUS**

AUTOR: ERICK RAMIREZ
TUTOR: PROF. SANDRA PRANCHART
Año: 2013.

ABSTRACT

Phytopathogenic viruses are infectious agents causing diseases in plants, producing mostly growth disorders and / or chlorotic symptoms, have the potential to destroy entire crops and even in cases which do not cause total losses, can reduce productivity or performance crops, which implies increasing production costs, affecting the quality and durability of the products harvested. To be able to implement prevention and control measures should be identify the causal agent. Hence, in this study it shows the diagnosis of phytopathogenic viruses in detail the ELISA, in order to contribute to their disclosure in order to support its use in agriculture. ELISA immunosorbent assay, is a diagnostic method where the antigen-antibody reaction is detected indirectly by the binding of the chromogenic substrate and his enzyme. Enzyme which is conjugated to an antibody which artificially produced, polyclonal or monoclonal, will be specific to recognize a viral particle, which is found in the samples of plant tissue extracts in study. Have been developed variants ELISA: direct, indirect, sandwich and indirect sandwich, the most frequently used Elisa Sandwich, offering greater sensitivity and specificity, this technique not only identifies the agent but allows to locate the infection, it is versatile, easy to implement, fast, can process large number and type of samples simultaneously, enables crop phytosanitary inspection before and after planting and certifies the quality of the propagation material free of pathogens.

Keywords: ELISA, phytopathogens virus, diagnostic methods.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO



CONSTANCIA DE ENTREGA

La presente es con la finalidad de hacer constar que el Trabajo Monográfico titulado: **ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO ELISA, EN EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS FITOPATÓGENOS**, presentado por el bachiller Erick Ramírez Titular de la cédula de Identidad No.17.643.417. Fue leído y se considera apto para su presentación desde el punto de vista metodológico, por lo que tiene el derecho de hacer la presentación final de su **TRABAJO MONOGRÁFICO**. Sin más a que hacer referencia, se firma a petición de la parte interesada a los ____ días del mes de mayo del año 2013.

Nombre del tutor: Prof. Sandra Planchart

C. I. N°: 6931877

Firma

Índice

Introducción	7
Virus fitopatógenos	
Definición.....	10
Morfología.....	11
Ciclo de vida	11
Mecanismo de transmisión.....	12
Métodos de diagnóstico.....	13
Ensayo inmunoabsorción ligado a una enzima, ELISA	
Fundamento.....	14
Tipos de ELISA.....	15
Antecedentes.....	17
Conclusiones y Recomendaciones	20
Bibliografía	22
Anexos	24

Introducción

Los virus son entidades biológicas submicroscópicas, que no pueden ser observados estructuralmente sin la ayuda de un microscopio electrónico. Se consideran la forma de vida más simple y son infecciosas, ya que sólo pueden reproducirse si están dentro de una célula viva de otro organismo, pudiendo infectar no solo animales y plantas sino hasta bacterias. Están compuestos por una pequeña porción de ácido nucleico de tipo ácido desoxirribonucleico (ADN) ó ácido ribonucleico (ARN) (el genoma), rodeado de una cubierta proteica (o cápside). Los virus son llamados también parásitos intracelulares obligados, ya que para su reproducción requieren de la célula hospedadora la mayoría de las enzimas necesarias para la síntesis de proteínas virales y la replicación del genoma viral ya que estos carecen de sistemas enzimáticos propios que produzcan energía, ribosomas para la síntesis de proteínas u otras organelas celulares. Todos los tipos de organismos vivos incluyendo animales, plantas, hongos y bacterias son hospedadores de virus y la mayoría de los virus, infecta solo un tipo de hospedador. Entre las plantas, las infecciones por virus pueden causar muchas e importantes enfermedades y son responsables por pérdidas en el rendimiento y la calidad de los cultivos en todas partes del mundo, reconociéndose estos virus como virus fitopatógenos. (1)

Así, los virus fitopatógenos, serán capaces de producir enfermedades en las plantas, pudiendo transmitirse no solo por medio de vectores como: artrópodos herbívoros, gusanos nematodos y hongos fitófagos, sino verticalmente a través de semillas y o cuando las siembras se dan por tubérculos o injertos. (1)

De las enfermedades que pueden sufrir las plantas, las producidas por virus forman el segundo grupo de importancia, superado solo por las enfermedades de etiología fungosa (2). Las enfermedades de las plantas tienen un considerable valor en la agricultura, no sólo porque poseen el potencial de destruir enteramente las cosechas, sino porque aún en los casos en que no causan pérdidas totales, por lo general reducen, la productividad o el rendimiento de la mayoría de los cultivos, obligando a tomar medidas de lucha que aumentan los costos de producción; afectando además la calidad y durabilidad de los productos cosechados. (3)

En España por ejemplo, la epidemia del virus de la tristeza de los cítricos, que desde 1957 ha infectado unos doce millones de árboles, causando la muerte de más de un millón de plantas obligando a un cambio importante en el cultivo del naranjo. Cabe citar también las epidemias de necrosis de tomate debidas a los virus del mosaico del pepino (CMV) y del bronceado del tomate (TSWV) que desde los últimos años han llevado a una reducción drástica de la superficie de dichos cultivos en buena parte de las áreas tradicionales de su producción en ese país .(3)

Sin embargo, además de los daños que pueden causar los virus, también pueden ser beneficiosos, es conocido sus usos en la protección de cultivos, cuando por ejemplo mediante la inoculación a plantas de cepas de virus atenuados se logra reducir el impacto de infecciones posteriores severas del mismo virus, empleados en las enfermedades de la mancha anular de la papaya y tristeza de los cítricos. También, el uso de virus entomopatógenos empleados en el combate contra insectos dañinos. (2)

Para poderse implementar medidas de control sobre una enfermedad determinada es necesario conocer al agente causal de la misma, a fin de que la acción a ejecutarse tenga el éxito esperado, para ello no sólo es suficiente el reconocimiento de los síntomas, ya que diversos virus pueden causar síntomas similares, y por otra parte las plantas pueden estar infectadas por más de un tipo o variante de virus, por lo que se hace necesario el empleo de diversas técnicas diagnósticas tanto a nivel de invernadero como de laboratorio (4)

Uno de los métodos de laboratorio mayormente empleados a nivel internacional, es el ensayo de inmunoabsorción enzimática ELISA (de sus siglas en inglés: enzyme linked immunosorbent assay) siendo extensivamente utilizado en la detección, identificación y cuantificación de patógenos en tejidos vegetales y otros sustratos. Debido a su sensibilidad, uso económico del antisuero, capacidad de cuantificar datos y facilidad de automatización en aplicaciones a larga escala, dicha prueba se ha convertido en una técnica popular y preferida en la detección y diagnóstico de enfermedades. (6) La aplicación de esta técnica en países que poseen una agricultura tecnificada ha permitido mejorar la calidad y sanidad

de los cultivos así como su competitividad y rentabilidad, igualmente ha dado pie a la planificación estratégica de cultivos y el manejo integrado de enfermedades.

Así, el manejo integrado de enfermedades virales en los cultivos, debe llevarse a cabo mediante el control de calidad fitosanitaria previo a la siembra y su diagnóstico temprano en campo, apoyado con el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y/u otras técnicas, pues se considera fundamental en el aspecto económico de la producción vegetal, ya que puede marcar la diferencia entre una agricultura competitiva o la pérdida de la cosecha. (7)

El uso de la técnica ELISA en Venezuela ha estado presente desde hace más de 20 años en rubros de interés alimentario como cítricos y recientemente en cultivos como tomate y pimentón, así como en cultivos ornamentales tales como orquídeas, entre otros. Sin embargo, el uso de este método en cualquiera de sus variantes ha estado asociado en su mayoría a proyectos de investigación que evalúan la detección de enfermedades causadas por fitopatógenos, siendo dirigidos por personal especializado y en muy pocas excepciones utilizado para atender la demanda del sector productivo, por ejemplo cuando se aplicó el método de ELISA para la detección del virus de la tristeza de los cítricos en la principal zona citrícola del país, en un esfuerzo en el que participaron muchas instituciones oficiales al servicio de la agricultura y la investigación en la década de los ochenta. (7)

Actualmente, son las Instituciones oficiales en Venezuela como, El Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA), quienes llevan programas para la producción de anticuerpos y estuches (kits) de ELISA para la detección de virus en plantas y proyectos para promover el uso de esta y otras técnicas, en beneficio de los productores agrícolas y de la población en general. (7)

Así, en este estudio se presenta el diagnóstico de virus fitopatógenos con detalle en el ELISA, con el fin de contribuir a su divulgación en aras de apoyar su empleo en el área agrícola.

VIRUS FITOPATÓGENOS

Definición

Las partículas virales más simples, están constituidas por un ácido nucléico, desoxirribonucleico ó ribonucleico, monocatenarios o bicatenarios, es decir de cadenas simples o dobles (ADN cs o ARN cs, ADN cd o ARN cd, respectivamente), el cual puede estar encapsulado en una cubierta de naturaleza proteica, la cual se dice protege la partícula viral, aunque más recientemente se ha determinado que participa en casi todas las etapas del ciclo de infección viral (8) El hecho de que los virus infecten células sanas en las que secuestran el sistema de reproducción para autoreplicarse trae como consecuencia la merma de las actividades metabólicas funcionales de dicha célula y eventualmente el tejido, así por ejemplo en plantas decae la habilidad de la misma para sus propios procesos de síntesis protéica, su sistema enzimático se trastorna, produciendo en la mayoría de los casos alteraciones del crecimiento (enanismo, distorsión, tumores, crecimiento en roseta por acortamiento, etc.) y síntomas cloróticos (amarillamiento de las hojas, totales, en mosaico o moteadas, manchas anulares, etc,) pero en otros casos pudiera ocasionar hasta la muerte de la planta como por ejemplo en la infección del frijol con virus del mosaico común(1).

Son variados los trabajos que condujeron el comienzo de la virología vegetal, iniciándose a finales del siglo XIX, cuando el microbiólogo holandés Martinus Beijerinck y el científico ruso Dimitri Iwanowski investigaban la causa de una misteriosa enfermedad del tabaco, estos investigadores, en forma independiente, describieron un agente inusual que causaba la enfermedad del mosaico en tabaco. Lo que distinguía a este agente, de otros agentes causales de enfermedades, era su tamaño, mucho menor al de las bacterias, microorganismo más pequeño conocido hasta la fecha. Este agente, posteriormente denominado “virus del mosaico del tabaco” (*Tobacco mosaic virus*, TMV), fue el primer virus en ser descrito. Desde entonces, un gran número de diversos virus han sido encontrados en plantas, animales, hongos y bacterias. El número actual de virus reconocidos está cerca de 4,000, de los cuales alrededor de 1,000 son virus vegetales. (1)

Morfología

Los virus vegetales se clasifican según la forma simétrica en que se dispone la proteína de su cápside, encontrándose dos tipos generales: helicoidal e icosaédrica. Entre los virus con simetría helicoidal (o elongados) se encuentran dos variantes, los de forma de bastones rígidos o filamentos flexuosos, en ambos casos el ácido nucléico toma la misma conformación helicoidal que la cápside protéica. Por otro lado, los virus con simetría icosaédrica pueden ser baciliformes y gemelos, estos últimos están compuestos por dos icosaédricos incompletos y en estos casos, el ácido nucléico dentro de la cápside está organizado parcialmente de forma esférica. (1,9)

El tamaño de las partículas virales puede variar, el diámetro típico de un virus vegetal esférico es aproximadamente 30 nm (0,03 μm). Las partículas rígidas, en forma de bastón, por ejemplo del TMV miden 300 x 18 nm (0,3 x 0,018 μm), en promedio están alrededor de 20 a 300nm. A modo de comparación, el tamaño típico de una célula de mesófilo foliar mide alrededor de 50 μm . (1, 9)

Son muy pocos los virus vegetales que poseen genomas de ADN de doble cadena o de cadena simple, la mayoría de los virus vegetales no presentan ADN en ningún momento de su ciclo replicativo, casi todos los virus vegetales están constituidos de ARN de cadena simple (ARN cs) los cuales tienen la misma polaridad (sentido positivo) que las moléculas de ARN mensajero de la célula. Sin embargo, debido a la enorme variabilidad en la naturaleza del material genético de los virus, los ciclos replicativos de diferentes virus son frecuentemente muy distintos entre sí. (1,8,9)

Ciclo de Vida

El comienzo del ciclo está representado por el ingreso del virus a la célula, este puede darse en forma pasiva por daño mecánico a través de heridas en la pared celular y cutícula de las plantas ya que los virus no son capaces de penetrar estas estructuras cuando están integra. Durante su ingreso de forma totalmente o parcialmente la cápside traspasará hacia el citoplasma de la célula hospedadora y una vez dentro se termina de desprender la cubierta proteica que rodea al virus. (1, 8)

Los virus de ADN deben ser transportados al núcleo para la transcripción y de esta manera tener acceso a las proteínas celulares necesarias para la producción de ARN mensajero (ARNm). Una vez en el citoplasma el ARN viral gracias a los ribosomas de la célula se traducirá en la producción de las proteínas virales que son necesarias para completar el ciclo de vida del virus. Entre ellas: las proteínas de replicación, esenciales para la producción de ácidos nucleicos; las proteínas estructurales, que conforman la cubierta proteica y otros componentes de los viriones; y en algunos casos de virus vegetales, las proteínas de movimiento, que intervienen en el transporte de las partículas virales entre las células de la planta. Posteriormente, las proteínas de replicación viral se combinan con las proteínas celulares para producir un complejo de proteínas que fabrican múltiples copias del genoma viral. Estos nuevos genomas interactúan con las proteínas estructurales para formar nuevos viriones. (1,8,10)

Es importante acotar que en el caso de los virus constituidos por ARN cs, va a variar el proceso de traducción. Así los ARN cs de sentido positivo son idénticos al ARNm viral y por tanto puede ser traducido inmediatamente por la célula huésped en el citoplasma, mientras que los ARN cs de sentido negativo, son complementarios del ARNm y por tanto deben ser convertidos en ARN positivo por una ARN polimerasa antes de ser traducidos.(8) El paso de una partícula viral de una célula a otra, se realizará a través de pequeños canales (poros intercelulares) que comunican las células vegetales llamados plasmodesmos y en algunos casos con ayuda de las proteínas de movimiento, que facilitan el paso de todas las moléculas virales entre las células. (10) Para que el virus pueda colonizar toda una planta necesita llegar al sistema vascular, donde es trasladado a larga distancia por medio del floema a las células circundantes para ser reproducido y diseminado nuevamente. El tiempo entre la infección inicial de una o pocas células y la infección sistémica, varía entre unos pocos días a semanas, dependiendo del virus, la planta y las condiciones ambientales. (1)

Mecanismo de transmisión

La transmisión de un virus de una planta a otra ocurre de forma activa, por medio de vectores como artrópodos herbívoros, nematodos, y hongos, por ejemplo: los áfidos y las moscas blancas son vectores capaces de transmitir varias especies de virus fitófagos (1). Sn

embargo, también puede darse la transmisión natural en el campo, entre plantas próximas al rosarse por la acción del viento o transmisión mecánica, debido a los daños ocasionados por los trabajos en los cultivos. También puede ocurrir transmisión vertical de los virus a través de semillas infectadas, estas generan plántulas que representan una fuente de propagación del virus. El polen también se relaciona con la transmisión vertical ya que cuando la infección llega hasta el polen este es desplazado por el viento, vectores, mecánicamente, etc. Además, algunos virus se transmiten a partir de plantas infectadas cuando éstas son propagadas vegetativamente utilizando, injertos, esquejes, tubérculos, bulbos o rizomas transmitiendo los virus de la planta madre a todas las plantas hijas. (2,8,9)

Métodos de Diagnóstico

Las técnicas de diagnóstico más utilizadas en virología vegetal se clasifican en biológicas, inmunológicas y génicas (1, 5).

Las técnicas biológicas se basan en diferentes propiedades de los virus, su patogenicidad, la transmisibilidad y morfología propiamente. La primera se refiere a bioensayos con plantas indicadoras, herbáceos o leñosos diferenciados para cada especie realizándose básicamente injertos; la segunda, se refiere a pases de transmisión mecánica es decir, ensayos con vectores; y finalmente, su forma, el análisis de la arquitectura de las partículas virales, las estructuras específicas del virus en células infectadas, lo que requiere de la microscopia electrónica. Todos estos métodos tienen como desventaja la laboriosidad de las técnicas aunado al tiempo que demoran en obtenerse los resultados. (1,5,9)

Las técnicas inmunológicas, utilizan las propiedades de la cubierta proteica de los virus, estas permiten identificar la presencia de un virus por medio de una reacción entre anticuerpos específicos que reconocen a dicha partícula vira, reconociéndose esto como el antígeno. Los anticuerpos, por otro lado son moléculas de inmunoglobulinas que son producidas como monoclonales y/o policlonales, en un animal (generalmente ratón o conejo) cuando les es inoculado un virus determinado para posteriormente obtener a gran escala, los anticuerpos específicos producidos (1). El método por excelencia en esta

categoría, es el ensayo de inmunoabsorción enzimática ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) y sus variantes. (9)

Las pruebas génicas, en cambio, utilizan las propiedades de los ácidos nucleicos virales como la reacción en cadena de la polimerasa RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). Esta permite la amplificación del RNA viral (es decir, producir múltiples copias), el cual podría estar presente en la planta aun en bajas concentraciones. (1,5). Y más recientemente la técnica resultante de la unión del ELISA y PCR, la reacción de inmunocaptura de la cadena de la polimerasa IC-RT-PCR (immuno capture reverse transcription polymerase chain reaction). (1)

Los métodos inmunológicos y génicos, actualmente son los más empleados y recomendados, teniendo como ventaja que son seguros, sensibles y aceptados en numerosos protocolos oficiales a nivel internacional. (5)

Ensayo inmunoenzimático, ELISA

Fundamento

El ensayo de inmunoabsorción Ligado a una enzima ELISA (por sus siglas en ingles Enzyme-Linked-ImmunosorbentAssay) es considerado como un importante hito en el avance del diagnóstico serológico de enfermedades causadas por microorganismos patógenos de plantas, especialmente por los virus. En este sentido y dada la facilidad que presenta el uso de antisueros económicos, la posibilidad de realizar aplicaciones a gran escala y por la sensibilidad que brinda, esta prueba se ha convertido en una técnica popular y preferida siendo frecuentemente empleada para la detección, identificación y cuantificación de patógenos en tejidos vegetales y otros tipos de muestras como suelos, semillas, extractos de plantas, etc. (6) Pudiendo resumir su uso o aplicación en los siguientes aspectos:

- 1.- Detectar presencia de virus en plantas, como por ejemplo en los estudios de diagnóstico y detección de agentes causales de enfermedad, ya que muchos síntomas producidos por varios virus pueden ser similares. (11)

2.- En el control de la calidad fitosanitaria de la semilla, permitiendo producir y certificar material de propagación, libre de patógenos. (7)

3.- Para localizar virus en tejidos o células. Reconocer el nivel de infección en algunas plantas. (11)

4.- Para establecer un control integrado de los cultivos previo a la siembra y un diagnóstico temprano. (7)

5.- Y permite cuantificar los resultados y estimar las concentraciones de los virus fotométricamente. (6,7,11)

La técnica de ELISA se basa en una reacción antígeno (partícula viral en un extracto de tejidos vegetales)-anticuerpo (inmunoglobulina comercial), que se visualiza por la reacción colorimétrica entre un conjugado (el anticuerpo que reconoce el antígeno y está ligado a una enzima) y el sustrato (cromógeno) al cual dicha enzima es afín (8). Esta se lleva cabo inmovilizando el antígeno en un soporte (fase sólida) de plástico, un tipo de policarbonato (o poliestireno) especial, mayormente conocido como placa de microtitulación, en las que luego se van realizando incubaciones secuenciales de anticuerpos, muestras y conjugados con lavados intermedios, con el fin de eliminar los excesos de reactivos y saturar las áreas de las placas donde no se hayan adherido las moléculas. Los resultados pueden evaluarse cualitativamente, es decir, mientras más intenso es el color producido en la reacción (enzima – sustrato cromo-génico) mayor es la concentración del virus en cada muestra, o cuantitativamente, mediante la lectura de la absorbancia (intensidad de color producido) en un espectrofotómetro o lector de placas de ELISA. (12)

Tipos de ELISA

En la realización de la técnica ELISA se encuentran variantes que permiten clasificarla como:

1. Directo: en este tipo de ensayo se emplean anticuerpos primarios conjugados a una enzima y que tienen la capacidad de reconocer un antígeno determinado, el cual está

fijado previamente a la superficie de la placa. Por último se adiciona el sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora empleada. (12)

2. Indirecto: Se utilizan dos tipos de anticuerpos; un anticuerpo primario contra el antígeno y un anticuerpo secundario conjugado a la enzima marcadora, el cual reconoce y se adhiere al anticuerpo primario, posteriormente se adiciona el sustrato correspondiente. (12)
3. ELISA Sándwich: El ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima con sándwich de doble anticuerpo DAS- ELISA(doublé antibody sándwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es una de las más empleadas en la detección de patógenos vegetales especialmente los virus. En este caso el antígeno es ubicado entre dos anticuerpos específicos; uno primario, de captura y un anticuerpo secundario de marcaje conjugado a la enzima marcadora que hidrolizará el sustrato afín aplicado. Esta técnica muestra mayor especificidad siendo además de gran utilidad sobre todo en la detección de patógenos en mezclas complejas, como: suelo, extractos de plantas y semillas. (6)

En el caso de detección y/o diagnóstico en sistemas vegetales, el método directo es el más sencillo, donde la reacción se produce entre el antígeno que se desea detectar (muestra: partículas virales que se encuentren en extractos del tejido vegetal) y un anticuerpo primario específico (monoclonal o policlonal) unido a una enzima. Debido a que la coloración involucra solo un anticuerpo marcado, la señal muchas veces no permite suficiente sensibilidad. Con las variantes de ELISA indirecto y Sándwich la sensibilidad puede amplificarse ya que se aseguran mayores puntos (epítopes) de adhesión del anticuerpo secundario incrementando la cantidad de enzima adsorbida para la catálisis del sustrato. (12)

Así, la técnica de ELISA resulta ventajosa pues con ella se pueden procesar muchas muestras simultáneamente; es de relativamente bajo costo y es un método rápido. Sin embargo, un resultado negativo con ELISA debería ser siempre confirmado usando PCR, para tener la seguridad de que no hay infección viral. (5)

Antecedentes

Existen actualmente una gran cantidad de trabajos de investigación en el ámbito de la detección de virus en plantas mediante ensayo de ELISA, especialmente en rubros que son de importancia económica debido a la demanda alimenticia de las poblaciones.

Así por ejemplo, Krstic B. y col, (2002) evaluaron los virus que afectan la calabaza (*Cucurbita pepo*) en 50 muestras tomadas de las plantaciones en Serbia, de cuatro regiones diferentes (Bački, Petrovac, Srbobran y Torda), empleando bioensayos con plantas indicadoras y la técnica inmunológica de ELISA usando anticuerpos policlonales. Reportando la presencia uno o dos virus en cada muestra, siendo la virosis mas prevalente en la calabaza ZYMV (Zucchini yellow mosaic potyvirus) (62%) y CMV (Cucumber mosaic virus) (58%). Observándose muy raramente WMV (watermelon mosaic virus) (13)

En este mismo sentido, para el Estado de Guanajuato, México, Pérez M. y col.(2004) empleando el ELISA-Sándwich identificaron de los agentes causales de las enfermedades con sintomatología característica de virosis como: engrosamiento foliar, mosaico, deformación de hojas, amarillamiento, empollamiento, etc.; que presentaban verduras como: la papa, calabacita, melón, sandía, pepino, jitomate, chile, ajo, espárrago y fresa; Detectaron distintos tipos de virus, en todos los rubros analizados, por ejemplo: el virus del enrollamiento, virus X, virus Y y virus S de la papa (PLRV, PVY, PVX y PVS respectivamente); en curcubitáceas, virus del mosaico del pepino, la calabaza, sandía variante, mancha anular de la papaya y mosaico amarillo de la calabaza (CMV, SqMV, WMV-2, PRSV y ZYMV respectivamente); en jitomate, virus de la marchites manchada del tomate (TSWV), etc; sin embargo, también detectaron virus que no se han reportado hasta la fecha en México, como por ejemplo: en el caso de la papa el PVA (*Pottato virus A*)

y el PVM (*Pottato virus M*) y el virus de la mancha anular del tomate (ToRSV). Este trabajo entonces permitió establecer la prevalencia, distribución y frecuencia de los virus encontrados en diferentes regiones, lo cual aporta información vital para el control de siembra. (4)

Robles L y col (2010) empleando las técnicas de ELISA, RT- PCR y una modificación del PCR; PCR Multiplex, evaluaron los virus fitopatógenos que afectan al cultivo del chile en México, con el fin de que esta información sea de utilidad a los productores en el establecimiento de medidas de prevención y control de estas enfermedades virales. Hasta la fecha se han reportado en México aproximadamente 13 especies de virus afectando el chile, entre ellos: TEV (virus jaspeado del tabaco), CMV (Virus del mosaico del tabaco), PMMoV (Virus moteado atenuado del chile), INSV (Virus mancha necrótica del impaciente), PepMV (Virus moteado del chile), AMV (Virus del mosaico del alfalfa), TbRV (Virus cascabel del tabaco), TBSV (Virus del enanismo ramificado del tomate), TRSV (Virus Mancha anular del tabaco), ToRSV (Virus mancha anular del tomate) y TSWV (Virus de la marchitez manchada del tomate). Dichos virus causan síntomas variados incluyendo enanismo, mosaicos, moteados, necrosis, clorosis, deformaciones, etc. Los autores reportan que no siempre la sintomatología es suficiente para determinar un diagnóstico, siendo imprescindible el empleo de técnicas serológicas y moleculares como ELISA y RT- PCR y/o PCR Multiplex, los cuales se presentan como métodos más precisos, confiables y rápidos. Destacando la técnica de ELISA como una de las pruebas más utilizadas debido a la su versatilidad y alta sensibilidad, mas sin embargo las técnicas moleculares no solo permiten detectar muy bajas concentraciones de virus, sino que con la variante Multiplex, se logran identificar varios virus simultáneamente en la misma muestra.(14)

Por otra parte, la técnica de ELISA muestra su versatilidad, en el estudio de los artrópodos como posibles vectores en el mecanismo de transmisión de virus fitopatógenos, en lo reportado por, Ahoonmanesh A. y col. (1990) quienes detectaron virus del mosaico del Alfalfa (AMV) en vectores áfidos, luego que estos habían ingerido material de plantas infectadas. Para esto emplearon el método de ELISA Sándwich indirecto (IDAS-ELISA),

que no es más que una modificación de la propuesta por Clark & Adams en 1977 del DAS-ELISA, en la que al agregar un 3er anticuerpo se puede amplificar la señal, lo que permite incrementar la sensibilidad en el orden de los pico gramos. Así, detectaron AMV en el orden de 150 pg en insectos lo que muestra que una significativa proporción de ellos pueden adquirir esta o una más alta cantidad de virus durante 1 minuto de ingesta sobre hojas de plantas infectadas. Los autores concluyen que la técnica de IDAS-ELISA puede aplicarse en estudios epidemiológicos y de control de vectores, permitiendo determinar las rutas migratorias de los mismos, tomando en cuenta la posibilidad de que vengan de cultivos infectados, a modo de establecer estrategias de control. (15)

En Venezuela, la aplicación del ELISA no enfrenta ningún impedimento, sin embargo debido a la falta de información que se maneja entre el personal profesional dedicado a las labores de producción agrícola así como también con el personal de laboratorio, se dificulta la adecuada planificación y ejecución de esta técnica en el campo de la producción vegetal. Además, de que se ha generado una matriz de información que minimiza el valor real que tiene la aplicación de esta técnica en cuanto al hecho de evitar o prevenir las enfermedades virales en las plantas, ya que estas no ocasionan daños directos en la salud del ser humano y por otra parte, así las plantas presenten síntomas crónicos, estos en algunos casos no ocasionan la pérdida total de la cosecha final. (7)

De aquí a que hayan pocas publicaciones asociadas a su uso, RodríguezY. y col. (1995). Mediante la técnica de ELISA Sándwich determinaron la presencia de virus en las distintas clases de semilla de papa que se importan y producen en el país. Analizaron 50 muestras de tubérculos de brotes apicales y laterales para cada clase de semilla provenientes de diferentes cultivares en los estados Mérida y Lara. Observaron que el virus detectado con mayor frecuencia para las semillas de clase certificada nacional e internacional fue el PVS, para la zona de Granola. Mientras que en el cultivar de Andinita, no se detectaron virus (ambas del Edo. Mérida). En los cultivares del Edo. Lara (Kenebec y Sebago) encontraron infecciones mixtas de PVS y PVX. Este trabajo refleja la importancia de control de siembra, ya que permite escoger cuales semillas son más adecuadas a emplearse para obtener generaciones saludables, ayudando así a disminuir los costos de producción. (16)

Conclusiones

Los virus fitopatógenos en mayoría son del tipo ARN de cadena simple que al afectar a las plantas producen síntomas variados entre los cuales: enanismo, amarillamiento (moteados o anillos cloróticos), mosaico, engrosamiento, deformaciones, etc.

Las infecciones por virus fitopatógenos han sido responsables de pérdidas en el rendimiento de cosechas a nivel global desde hace mucho tiempo, estos causan disminución de la calidad en los frutos y pérdidas completas de cultivos en diferentes tipos de vegetales que son de vital importancia para el consumo humano. Por esta razón se hace necesario el uso de técnicas de diagnóstico que garanticen la aplicación de medidas adecuadas de prevención y control para el buen desarrollo de los cultivos.

Los métodos de diagnóstico inmunológico como el ELISA y sus variantes, son técnicas de alta sensibilidad y especificidad, ampliamente utilizados en la actualidad para el diagnóstico de enfermedades causadas por virus y otros agentes patógenos en plantas, permiten además reconocer el nivel y ubicación de la infección, es versátil, de fácil ejecución, rápido y puede procesar amplio número y tipo de muestras simultáneamente, como: extractos de hojas, tubérculos, semillas, suelos, macerados de artrópodos, etc.

La técnica de ELISA permite llevar el control fitosanitario de los cultivos previo y posterior a la siembra y certificar la calidad de material de propagación (semillas e injertos) libres de patógenos.

Las pruebas moleculares, son de gran importancia, ya que en los casos de ELISA negativo no necesariamente signifique que la planta esté libre de infección, ya que puede encontrarse el virus en bajas concentraciones y debe confirmarse con PCR y/o sus variantes.

Recomendaciones

La falta de conocimiento frente a la utilidad que puede tener el diagnóstico temprano de los agentes causales de enfermedades en plantas asociado a la posibilidad de la aplicación de

técnicas inmunológicas como el ELISA, se debe a que no hay políticas gubernamentales relacionadas con la actividad agrícola a pequeña o gran escala que fiscalicen procesos de calidad desde el momento de la siembra, crecimiento, durante la cosecha, y en la compra y venta de semillas, injertos, etc., por ejemplo. El estado tiene que garantizar calidad en los productos y debe fiscalizar los mismos, en todos los niveles de producción.

El Estado debe fomentar la actividad investigativa y de divulgación de las ventajas de estos métodos diagnósticos para promover mejores cultivos y producción.

La Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, podría incluir información básica de fitopatología en la carrera de Técnico Superior en Histotecnología, con el fin de generar conocimientos acerca de los aspectos teórico-prácticos de los métodos de diagnósticos en enfermedades de plantas, para apoyar en la formación de personal capacitado.

Bibliografía

1. Gergerich R., Dolja V. Introduction to plant viruses, the invisible foe. 2006. In The American Phytopathological Society, 2013. Disponible en <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/PlantVirusesEspanol.aspx>
2. Arauz L. Capítulo 4: Virus y Viroides Fitopatógenos. 1era ed. Comisión Editorial de la Universidad de Costa Rica, Fitopatología un enfoque agroecológico, Costa Rica. 1998, p: 58-87. Disponible en: <http://booklens.com/luis-felipe-arauz-avallini/fitopatologia>
3. Macías. O., Delgado Y., Peña E., León R., Barreto R. Monografía: Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos. UNIVERSIDAD DE MATANZAS CAMILO CIENFUEGOS. Facultad de Agronomía. 2006 p:1-30
4. Pérez M., Rico E., Sánchez J., Ascencio J., Días R., Rivera R. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el Estado de Guanajuato, México. Rev Mex Fito. 2004; 22: 187-197.
5. Cruzat R., Montes C. Resultados y lecciones en detección y caracterización de virus y fitoplasmas en Vid. Proyecto IV Región de Coquimbo y VII Región del Maule. Serie Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario. Fundación para la Innovación Agraria de Chile, Ministerio de Agricultura de Chile, FIA. 2009. p: 5-15.
6. Clark M., Adams A. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plants viruses. J. gen.Virol. 1977 (34): 475-
7. Rangel E., Schmidt A., Centeno, F. Implementación de la técnica de ELISA para la detección de virus y otros patógenos en plantas en Venezuela. Rev. Dig. CENIAP HOY Aragua, Venezuela. 2006 (10). Disponible en: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/
8. Ivanov K., Mäkinen K. Coat proteins, host factors and plant viral replication, Review. Curr Opin Virol. 2012 (6):712-718.

9. Sepúlveda P., Rosales M., Rojas C., Medina C., Sepúlveda G, Brown J, Mora R. Virus transmitidos por insectos en tomate en la región de Arica y Parinacota, situación actual y manejo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chile. Boletín INIA. 2011(224).p:13-31.
10. Tilsner J., Oparka K. The connection between replication and movement of plant RNA viruses. Review Curr Opin Virol. 2012(6):705-11.
11. ORTEGA E. Métodos de detección virus y viroides en cítricas. Revista Digital FONAIAP-Campo Exp. Caripe. 2004 Disponible en http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd22/texto/metodos.htm
12. Batista L, Peña I, López D, Pérez J, Llauger R. Técnicas de diagnóstico de enfermedades que afectan a los cítricos. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba 2006 p: 3-15. Disponible en <http://www.concitver.com/manualdesaneamientoydiagnostico>
13. Krstic B., Berenji J., Dukic N., Vico I., Katis N., Papavassilioun C. Identification of viruses infecting pumpkins in Serbia. Proceed Nat Sci. 2002 (103): 67-79.
14. Robles L., González A., Monserrath E., Pérez L., López J. Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. Tecnociencia de Chiguagua. 2010 (2):72-86.
15. Ahoonmanesh A., Hajimorad M., Ingham B., Francki R. Indirect double antibody sandwich ELISA detecting alfalfa mosaic virus in aphids after shot probes on infected plants. J virol Meths. 1990 (30):271-282.
16. Rodríguez Y., Ortega E., Trujillo G. Detección de los virus PLRV, PVY, PVX y PVS en brotes de tubérculos de papa por la técnica serológica de ELISA. Revista Latinoamericana de la Papa. 1995 (8):94-101.

ANEXOS

Fig.1

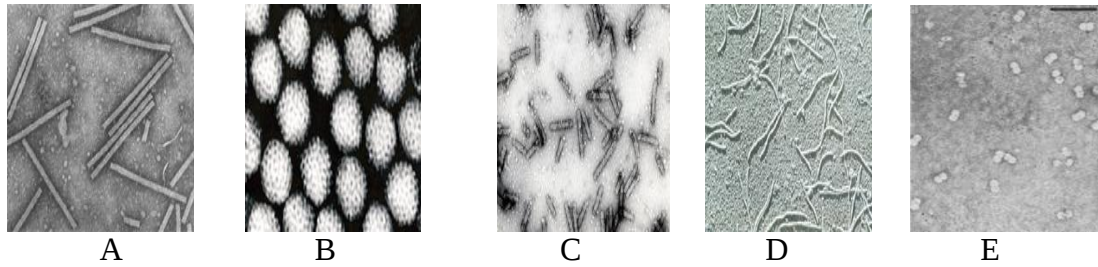


Fig. 1. Morfología de los virus fitopatógenos: **A.** Bastones rígidos, **B.** Icosaédricos **C.** Baciliformes **D.** Filamentos flexuosos **E.** Gemelos.

Fig. 2

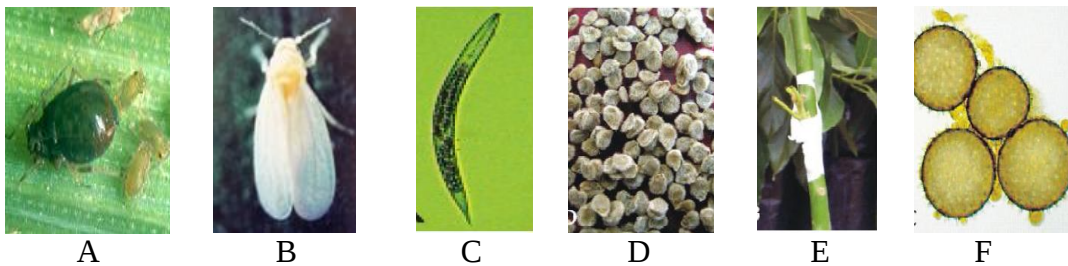


Fig. 2 Vectores y medios de propagación de virus: **A.** Afidios **B.** Mosca blanca **C.** nematodos **D.** Semillas **E.** Injertos **F.** Polen

Fig. 3

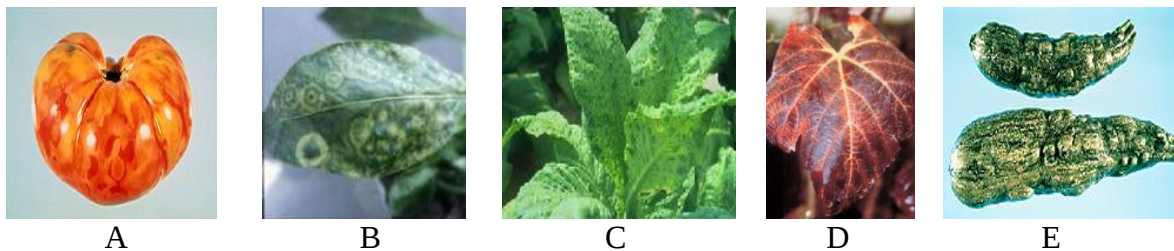


Fig. 3 Síntomas causados por virus fitopatógenos: **A y B.** Anillos cloróticos, **C.** Mosaico del Tabaco (TMV), **D.** Enrollamiento de hojas amarillamiento en nervaduras, **E.** Malformación

Fig. 4

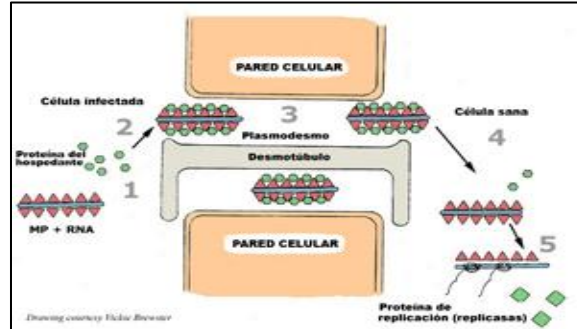


Fig. 4 Paso de partículas virales entre células a través de un plasmodesmo con la ayuda de proteínas de movimiento

Fig. 5

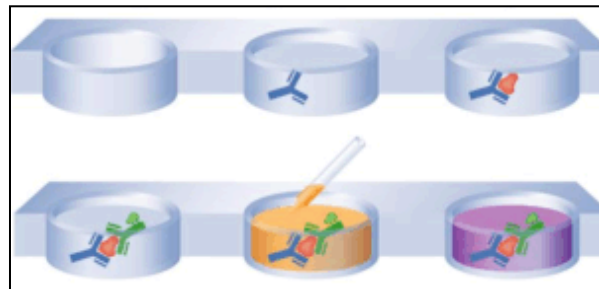


Fig. 5 Esquema de DAS-ELISA: Secuencia de adición de anticuerpo primario, antígeno, anticuerpo secundario marcado con una enzima, por ultimo la adición del sustrato y revelado del color de la reaccion.

Fig. 6



Fig. 6. Microplaca de usada en la técnica ELISA después de la adición del sustrato de la enzima, pozos con coloración amarilla, indicando positivo a la reacción antígeno-anticuerpo. La intensidad de color refleja mayor o menor concentración de antígeno.