



Desarrollo y uso de un sistema serológico para la detección del virus de la tristeza en el análisis masivo de muestras de cítricos

MARÍA MAGDALENA IRACHETA CÁRDENAS*, MARIO ALBERTO ROCHA PEÑA*



El virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV) es de distribución mundial, y ocasiona una de las enfermedades más destructivas en el cultivo de los cítricos.^{1,5,18,28} En los últimos 80 años han ocurrido epifitias severas a causa del CTV en diferentes lugares del mundo, con pérdidas estimadas en más de 100 millones de árboles injertados en naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.).¹⁸ Por lo anterior, anualmente, en diversos países se llevan a cabo campañas intensivas de detección de árboles infectados, con el objetivo de evitar la diseminación del virus, para prevenir el desarrollo de epifitias.^{3,7,16,22,25,29,33}

Desde que la técnica ELISA se implementó para la detección del CTV,³ se han desarrollado varios protocolos de la misma,^{2,8,11,27} por lo que ésta se ha convertido en una herramienta indispensable a nivel mundial para el análisis masivo de muestras de cítricos, con fines de investigación y manejo integrado de la enfermedad. La produc-

ción de anticuerpos para la detección del CTV, ya sean policlonales^{2,12} o monoclonales,^{6,21,31} se ha logrado con preparaciones purificadas de virus como inmunógeno. Cabe mencionar que algunos de los anticuerpos desarrollados en el pasado se utilizan en forma rutinaria en actividades de investigación específicas, mientras que otros han estado disponibles en forma comercial, a través de varias compañías para el análisis masivo de muestras de cítricos a nivel mundial. En adición a lo anterior, varios grupos de investigación han desarrollado anticuerpos policlonales hacia la proteína recombinante (prb) del gen p25 de la cubierta proteica del CTV.^{17,19,30} Sin embargo, tales anticuerpos han mostrado resultados inconsistentes como anticuerpos primarios (de tapizado) bajo condiciones no desnaturalizantes;^{4,19,20} por lo anterior, su empleo a gran escala se ha restringido sólo como anticuerpo intermedio en pruebas ELISA de doble sandwich indirecta (ELISA-DASI),^{19,25} (Polek, ML, datos no publicados). En nuestro laboratorio hemos desarrollado anticuerpos contra la prb para varios aislamientos mexicanos del CTV en cabras y conejos, los cuales tienen una marcada particu-

□ El presente artículo está basado en la investigación "Desarrollo y uso de un sistema serológico para la detección del virus de la tristeza en el análisis masivo de muestras de cítricos", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2010 en la categoría de Ciencias de la Tierra y Agropecuarias, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2010.

*Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México CP 66450. México
Este trabajo fue publicado en *Plant Disease* 93:11-16 (2009).

laridad de poder emplearse como anticuerpos primarios (atrapantes de virus en placas de microtitulación) y como anticuerpos intermedios (detectantes) en pruebas ELISA-DASI.¹⁵ En el presente trabajo se reporta: 1) el desarrollo y uso de un sistema para la detección serológica del CTV, con base en el empleo de anticuerpos prb y su utilidad para el análisis masivo de muestras de cítricos. 2) Su reactividad con una colección de aislamientos del CTV, con diferentes propiedades biológicas y de orígenes geográficos diversos. 3) Su comparación con otros dos kits de detección.

Materiales y métodos

Fuente de anticuerpos

Los anticuerpos empleados fueron los siguientes: 1) anticuerpos desarrollados en cabra (T1) y conejo (C3)¹⁵ obtenidos contra la prb sin marca de los aislamientos mexicanos MX08 y MX14 del CTV, respectivamente, expresada en *Escherichia coli*.¹³ 2) Anticuerpos empleados rutinariamente en el protocolo de detección del CTV empleado por la Agencia de Erradicación del Virus de la Tristeza del Valle Central California (Central California Tristeza Eradication Agency = CCTEA), el cual se integra de anticuerpos primarios e intermedios policlonales desarrollados en cabra y conejo, respectivamente. Los anticuerpos primarios (de tapizado) se desarrollaron contra partículas completas del virus (proporcionados por el Programa de Protección Clonal de Cítricos (= California Citrus Clonal Program (CCPP) de la Universidad de California (Dept. Plant Pathology, UC Riverside, California)); los anticuerpos intermedios se desarrollaron contra una prb fusionada a maltosa, a partir del aislamiento SY568 del CTV de California.¹⁹ La tercera fuente de anticuerpos fue el kit comercial de Agdia SRA 78900/1000 (Elkhart, Indiana, USA). Los anticuerpos prb de cabra T1 y conejo C3 se purificaron mediante precipitación con sulfato de amonio, y se ajustaron a una con-

centración de 1.0 mg/ml ($OD_{280} = 1.45$) por espectrofotometría.⁹

Muestras de tejido

El tejido de cítricos analizado fue de tres orígenes: 1) muestras de cítricos de la colección internacional de aislamientos del CTV del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), ubicado en Beltsville, Maryland, EUA.¹⁰ Estos 69 aislamientos representan los diez grupos de razas biológicamente caracterizadas de orígenes geográficos diversos. 2) Muestras de cítricos de la colección de aislamientos del CTV de California mantenidos bajo condiciones de invernadero en la sede del CCTEA en Tulare, California, USA. Estos aislamientos representan todos los grupos de razas biológicamente caracterizadas de California.²³ 3) Muestras de cítricos colectadas en plantaciones comerciales como parte del programa regular del CCTEA en el Valle Central de San Joaquín.

Colecta de tejido y preparación de muestras

La colecta de tejido se llevó a cabo mediante una metodología estandarizada desarrollada por la CCTEA,²⁵ la cual consistió en coleccionar muestras de ocho a diez brotes tiernos, con hojas totalmente expandidas de cada planta de cítricos; se colocaron éstas en bolsas de plástico, se etiquetaron y se transportaron al laboratorio en hieleras. Una vez en el laboratorio, de cada muestra se molieron 0.5 gramos de pecíolos en 5 ml de solución amortiguadora de extracción (solución salina de fosfatos (PBS salina)), adicionada con 0.05% de Tween 20, 2% de polivinilpirrolidona y 0.2% de albúmina de suero bovina (p/v), con un homogenizador de tejidos Kleco. En relación a la colección internacional de aislamientos del CTV bajo resguardo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, las muestras correspondientes se prepararon en las instalaciones del USDA en Beltsville, Maryland, en forma de tejido desecado, y siguiendo las normas legales res-

pectivas se empacaron y se enviaron a la sede del USDA, en Riverside California, para su análisis; las muestras de tejido desecado se conservaron a -20°C , previo a su evaluación; 25 mg de tejido desecado de cada aislamiento del CTV se rehidrataron en 5 ml de solución amortiguadora de extracción, durante 24 h; posteriormente, en forma individual, cada muestra de tejido se trituró en el homogenizador de tejido Kleco, como se mencionó previamente.

Pruebas serológicas

Todas las pruebas serológicas se llevaron a cabo de acuerdo al sistema de ELISA sandwich de doble anticuerpo indirecto (DASI),⁹ en placas de microtitulación Nunc Maxisorb fondo plano, con volúmenes de 100 μl por pocillo, y se aplicaron tres lavados entre cada uno de los pasos con solución de lavado (PBS-salina-Tween 0.5%). Las placas se tapizaron con los anticuerpos diluidos en solución amortiguadora de carbonatos, y se incubaron por 6 h a 37°C . Y las muestras de cítricos (antígenos) se incubaron durante 16-18 h a 5°C ; cada uno de los anticuerpos intermedios se diluyó en solución de extracción, y se incubaron 4 h a 37°C . Después de los lavados, los conjugados enzimáticos correspondientes se diluyeron en solución de extracción, y se incubaron por 2 h a 37°C . Al final se aplicó la solución colorimétrica, durante 60 min, compuesta por 1.0 mg/ml de p-nitrofenil fosfato (Sigma N 2765), en 10% de dietanolamina, pH 9.8, y se cuantificó mediante espectrofotometría a una densidad óptica de 405 nm (DO_{405}). Los anticuerpos prb de cabra T1 (tapizado) y de conejo C3 (intermedio) se emplearon a concentraciones de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente; el conjugado enzimático de cabra anti-igG de conejo (Sigma A3812) se empleó a una dilución de 1:30,000. Los anticuerpos de la CCTEA se emplearon de acuerdo al protocolo preestablecido,³¹ y el kit de detección de Agdia se usó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En cada experimento se incluyeron dos re-

peticiones de cada muestra de cítricos; asimismo, se incluyeron muestras estándar de extractos de tejido de cítricos de naranja dulce, toronja, mandarina (*C. reticulata* blanco) infectadas por el CTV, así como extractos de plantas sanas de las mismas especies crecidas en el invernadero, a manera de controles positivos y negativos, respectivamente. Cada placa ELISA contó con un mínimo de dos repeticiones de extractos de cada control positivo y negativo de naranja dulce, toronja y mandarina. Se consideraron muestras positivas (+) al CTV, cuando la lectura de la DO_{405} fue dos veces mayor al valor de la media de las muestras provenientes de plantas sanas. Se consideraron como muestras negativas (–) las que mostraron valores de DO_{405} menores de 0.100, o dos veces la media de los extractos de plantas sanas. El criterio con base en los valores de las lecturas de DO_{405} , para discriminar muestras positivas o negativas al CTV fue sólo estimativo, y se utiliza en forma rutinaria en el programa anual de monitoreo de plantas de cítricos con fines de erradicación por la CCTEA.

Resultados

Reactividad de la combinación de anticuerpos prb cabra T1 y conejo C3 con la colección internacional de aislamientos del CTV de orígenes geográficos diversos

Esta parte del trabajo se condujo en las instalaciones del Repositorio Nacional de Germoplasma de Cítricos del USDA, localizado en Riverside, California, empleando 69 aislamientos del CTV que representan todas las propiedades biológicas del CTV. En los ensayos ELISA-DASI con los anticuerpos prb T1/C3 todos los aislamientos del CTV evaluados mostraron valores de DO_{405} entre 0.250 y 2.200. Seis (8.69%) aislamientos dieron valores de DO_{405} entre 0.200 y 0.500, nueve (13.04%) entre 0.500 y 1.000, 30 (43.47%) entre 1.000 y 1.500, 20 (28.98%) entre 1.500 y 2.000, y cuatro (5.79%) arriba de 2.000. Por el contrario, los valores de DO_{405} para las muestras

de tejido sano fueron menores a 0.100. Y los valores de DO_{405} para las muestras de tejido sano fueron menores a 0.100.

Comparación de la combinación de anticuerpos prb cabra T1 y conejo C3, con el protocolo de la CCTEA y un kit comercial de detección del CTV

Esta parte del trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de la CCTEA, localizada en Tulare, California, con una colección de 280 aislamientos del CTV de California, mantenidos bajo condiciones de invernadero. En el primer ensayo se emplearon 40 aislamientos de la colección del CTV de California, para comparar la combinación T1/C3 con el protocolo de la CCTEA y el estuche comercial de Agdia (figura 1). Las tres fuentes de anticuerpos discriminaron en forma consistente las muestras positivas al CTV de las muestras de plantas sanas con valores de DO_{405} , que oscilaron entre 0.250 y 1.850 para todo el tejido infectado; mientras que para las muestras de tejido sano los valores de DO_{405} fueron menores a 0.100 para las tres fuentes de anticuerpos (figura 1). Adicionalmente, se observó 100% de coincidencia en la discriminación de muestras positivas de las nega-

tivas en los tres sistemas de detección del CTV (figura 1). En una segunda evaluación se emplearon 240 aislamientos adicionales del CTV de California, para comparar en forma individual la combinación de anticuerpos prb T1/C3 y el protocolo de detección de la CCTEA. De nueva cuenta, ambos sistemas de detección mostraron 100% de coincidencia en la discriminación entre muestras positivas la CTV de plantas sanas (tabla I); 152 aislamientos (63.33%) dieron valores de DO_{405} similares con menos de 0.100 de diferencia; 77 (27.91%) dieron valores de DO_{405} mayores con más de 0.100 por el protocolo de la CCTEA, en comparación con la combinación de anticuerpos prb T1/C3; asimismo, 21 (8.75%) aislamientos dieron valores de DO_{405} mayores con más de 0.100, por la combinación cabra T1/conejo C3, en comparación con el protocolo de la CCTEA (tabla I).

Evaluación de los anticuerpos prb cabra T1 y conejo C3 con muestras de campo

Esta parte del trabajo también se llevó a cabo en las instalaciones de la CCTEA, localizada en Tulare, California, en la que se evaluó la eficiencia

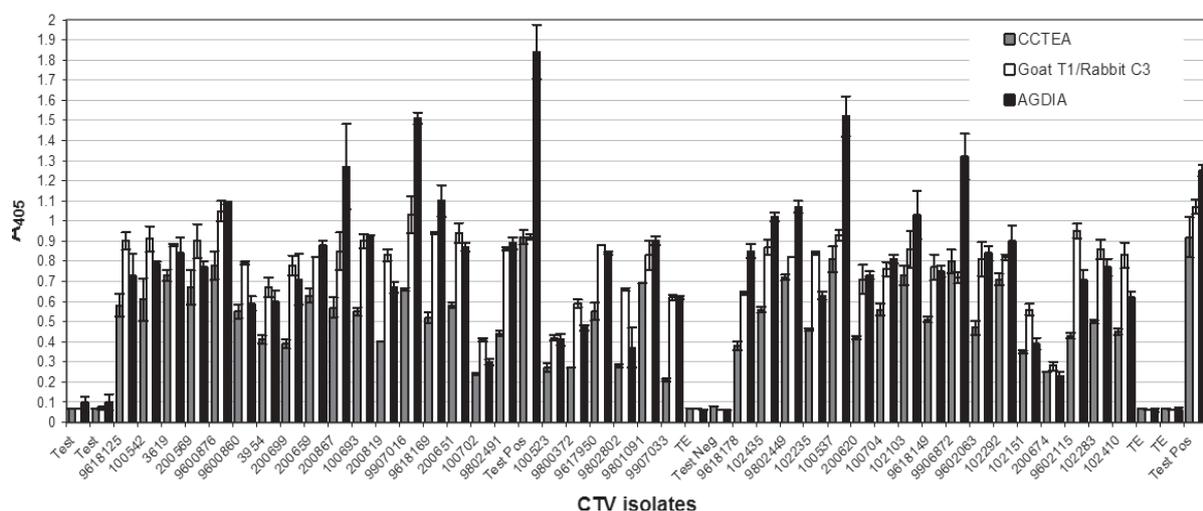


Fig. 1. Comparación de la combinación de anticuerpos prb cabra T1/conejo C3, con los anticuerpos contenidos en el protocolo de la CCTEA y del kit comercial de Agdia para la detección del CTV con 40 aislamientos del CTV de California. La barra superior de cada lectura de densidad óptica (DO_{405}) indica la desviación estándar de dos repeticiones de cada aislamiento (ver detalles en tabla I y en "Materiales y métodos").

Tabla I. Comparación de los anticuerpos prb cabra T1/conejo C3, con el protocolo de la CCTEA para la detección del virus de la tristeza, con 260 aislamientos del de CTV de California (ver detalles en "Materiales y métodos").

Aislamiento del CTV	Valores similares de OD ₄₀₅ (< 0.100 diferentes) entre el protocolo de la CCTEA vs T1/C3 ^{1/}	Valores mayores de 0.100 por el protocolo de la CCTEA vs T1/C3	Valores mayores de 0.100 por la combinación T1/C3 vs el protocolo de la CCTEA	Total
41-88	18 (37.50) ^{2/}	23 (48.00)	7 (14.58)	48(100)
89-136	33 (68.75)	10 (20.83)	5 (10.41)	48(100)
137-184	34 (70.84)	9 (18.75)	5 (10.41)	48(100)
185-232	37 (77.08)	7 (14.58)	4 (8.33)	48(100)
233-280	30 (62.50)	18 (37.50)	0 (0%)	48(100)
Total	152	67	21	240(100)

^{1/} Lecturas iguales de OD₄₀₅ iguales o < 0.100 entre ellos

^{2/} Número de muestras (%).

Tabla II. Comparación serológica entre el protocolo de la CCTEA y la combinación de anticuerpos prb T1/C3, con muestras de campo de variedades de mandarina y controles sanos (negativos) e infectados (positivos) al CTV en ensayos de ELISA- DASI (ver detalles en "Materiales y métodos").

Protocolo CCTEA						
Lote	Total de muestras	Media OD ₄₀₅ [*]	Rango OD ₄₀₅	Número de muestras positivas **	Control sano OD ₄₀₅	Control positivo OD ₄₀₅
45A	144	0.139	0.207-0.101	20	0.083	1.337
04B	93	0.117	0.183-0.079	19	0.079	1.177
06 ^a	117	0.112	0.213-0.078	19	0.079	1.216
04F	42	0.120	0.182-0.087	3	0.083	1.323
04G	42	0.121	0.163-0.083	4	0.074	1.206
Total	428			45		

Combinación de anticuerpos prb T1/C3						
Lote	Total de muestras	Media OD ₄₀₅ [*]	Rango OD ₄₀₅	Número de muestras positivas **	Control sano OD ₄₀₅	Control positivo OD ₄₀₅
45A	144	0.065	0.097-0.061	0	0.064	1.273
04B	93	0.061	0.065-0.060	0	0.059	1.175
06 ^a	117	0.062	0.074-0.057	0	0.060	1.166
04F	42	0.057	0.070-0.053	0	0.053	1.008
04G	42	0.061	0.070-0.056	0	0.060	1.044
Total	428			0		

* Densidad óptica a 405nm (DO₄₀₅) después de 60 min de reacción de la solución de sustrato. Promedio de dos repeticiones por placa de microtitulación ELISA. Las reacciones se consideraron positivas (+) cuando la media de DO₄₀₅ fue mayor a dos veces la media de las lecturas de los testigos de plantas sanas o 0.100, cualquiera que fuera mayor. Los valores menores a 0.100 de DO₄₀₅ se consideraron negativos (-).

** Los números de "muestras positivas" con el protocolo de la CCTEA son de hecho falsos positivos.

de los anticuerpos prb T1/C3 para el análisis masivo de muestras colectadas a nivel de campo. En un primer ensayo se evaluaron cinco lotes plantados con diversas variedades de mandarina, las cuales, con anterioridad, han arrojado valores atípicamente altos de DO_{405} en pruebas DASI-ELISA, durante los muestreos de primavera del programa de erradicación de la CCTEA.^{24,32} Con el protocolo de la CCTEA se obtuvieron valores de DO_{405} , en el rango de 0.083-0.213 en 480 muestras de mandarinas (tabla II). Por el contrario, para estas mismas 480 muestras de mandarinas, analizadas con la combinación de anticuerpos prb T1/C3, se obtuvieron valores de DO_{405} en el rango de 0.056-0.097. En ambos ensayos, para los muestras de plantas sanas (testigos negativos), se obtuvieron en forma consistente valores de DO_{405} menores de 0.100. Asimismo, las muestras de tejido de cítricos incluidas como controles positivos arrojaron valores de DO_{405} entre 1.177-1.337 con los anticuerpos empleados en el protocolo de la CCTEA y de 1.008-1.273, con la combinación de anticuerpos prb T1/C3 (tabla II). Con base en el criterio para identificar muestras positivas (+) al CTV establecido, hubo cero muestras positivas al CTV, detectadas con la combinación de anticuerpos prb T1/C3; por el contrario, con los anticuerpos empleados en el protocolo de la CCTEA resultaron 45 muestras potencialmente positivas al CTV en estos cuatro lotes de mandarinas a nivel de campo (tabla II).

En un estudio previo,³² las mismas muestras de mandarinas sospechosas de estar infectadas por el CTV se determinó que eran negativas al CTV, mediante métodos moleculares de inmunocaptura (IC) y RT-PCR; por lo tanto, nuestra conclusión fue que en realidad las 45 muestras de mandarinas, potencialmente positivas al CTV, son en realidad falsos positivos. En un ensayo final se evaluó de nuevo la combinación de anticuerpos prb T1/C3, con muestras de campo colectadas en plantaciones comerciales como parte del programa regular de monitoreo de la CCTEA. La evaluación incluyó 41,195 muestras de 301 huertas comerciales de los distritos 1, 2 y 3 del Valle Central de California. Se encontró un total de 26 árboles positivos al CTV, con los anticuerpos prb T1/C3, con 0.063 por ciento de muestras infectadas por el CTV (tabla III).

Discusión

En el presente trabajo se reportan las ventajas de usar anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante prb de la proteína de la cubierta del CTV, como anticuerpos primarios o atrapantes (cabra T1), para tapizar las placas de microtitulación, y como anticuerpos intermedios (conejo C3) para detectar al antígeno en pruebas de DASI-ELISA, a manera de *kit* completo para la detección del CTV. El empleo de la combinación T1/C3 resultó en una detección consistente del

Tabla III. Detección del CTV, con la combinación de anticuerpos prb T1/C3, a partir de muestras de campo de plantaciones jóvenes (< 5 años) de naranja dulce y variedades de mandarinas colectadas, de marzo a junio del 2007, en tres distritos de tres municipios del Valle Central de San Joaquín, California.

Distrito No.	Número de huertas muestreadas	Número de muestras	Número de muestras positivas al CTV	% muestras positivas al CTV
1	54	5,268	0	0.000
2	233	34,559	15	0.043
3	14	1,368	11	0.804
Total	301	41,195	26	0.063

CTV en muestras de cítricos, y la discriminación de plantas sanas e infectadas fue más que satisfactoria. Los anticuerpos prb T1/C3 mostraron 100% de detección en una colección de 69 aislamientos del CTV de orígenes geográficos diversos que ocasionan un amplio espectro de síntomas en diferentes hospedantes cítricos, como: declinamiento, amarillamiento de plántulas, picado de tallo en naranja y toronja, así como síntomas débiles y combinaciones de estos síntomas. Estos aislamientos del CTV representan poblaciones del virus de 18 países, en cinco continentes. En 93% de los aislamientos se detectaron, en forma consistente, lecturas de densidad óptica DO_{405} en el rango de 0.500 a 2.200; solamente seis aislamientos dieron lecturas de DO_{405} en el rango de 0.200 y 0.500, lo cual es considerado de todas formas adecuado para la detección del virus, cuando las lecturas de DO_{405} para las plantas sanas utilizadas como controles negativos fueron inferiores a 0.100. Los resultados anteriores demostraron la capacidad de los anticuerpos prb de cabra T1 y conejo C3 para reconocer una gama amplia de aislamientos del CTV, con propiedades biológicas diversas y de diferentes orígenes geográficos.

La combinación de anticuerpos prb T1/C3 también mostró 100% de detección con los 280 aislamientos del CTV de California (figura 1, tabla I). Estos aislamientos del CTV ocasionan una gama de síntomas en diferentes hospedantes cítricos y representan los aislamientos del CTV encontrados en plantaciones comerciales de cítricos en California, desde 1993.²³ Los resultados obtenidos con la combinación de anticuerpos prb T1/C3 con los aislamientos de California fue igualmente eficiente que la lograda con los anticuerpos contenidos en el protocolo de la CCTEA, así como con el *kit* de detección de Agdia, respectivamente, con 100% de detección del CTV por las tres fuentes de anticuerpos. No obstante, se encontraron algunas pequeñas diferencias en las lecturas de densidad óptica DO_{405} obtenidas con la combinación de anticuerpos prb T1/C3, comparada con los anticuerpos del protocolo de la

CCTEA y del *kit* de detección de Agdia (figura 1, tabla I); sin embargo, tales diferencias fueron similares a las que normalmente se encuentran cuando se comparan varios *kits* comerciales de detección del CTV,¹⁴ y se puede explicar con base en la naturaleza de los anticuerpos contenidos en cada *kit* de detección,¹⁴ y que se relaciona con la concentración particular de los anticuerpos empleados y la especificidad de los mismos.

Un rasgo notable de los anticuerpos prb de cabra T1 y conejo C3 fue su utilidad para el análisis masivo de muestras de cítricos (tablas II y III), e incluye los cultivares de mandarina que en estudios previos han mostrado valores altos de densidad óptica DO_{405} , con la combinación de anticuerpos contenida en el protocolo de la CCTEA.^{24,32} En el presente estudio, los valores de lectura DO_{405} , obtenidos con los anticuerpos del protocolo de la CCTEA con las muestras de mandarina, oscilaron en el rango de 0.083 a 0.213, mientras que las lecturas DO_{405} con las mismas muestras de mandarinas analizadas con la combinación de anticuerpos prb T1 y C3 estuvieron en el rango de 0.056 a 0.097 (tabla II). El porqué ocurrió este fenómeno con los anticuerpos contenidos en el protocolo de la CCTEA, y no con la combinación de T1/C3, podría explicarse por la naturaleza de los anticuerpos contenidos en cada uno de los sistemas de detección. En el protocolo de la CCTEA se emplean como anticuerpos primarios cabra anti-CTV desarrollados contra partículas completas del virus y como anticuerpos intermedios emplea anticuerpos desarrollados contra la proteína de fusión recombinante de maltosa (MBS) (prb-MBS) del aislamiento SY568 del CTV de California.¹⁹ Por el contrario, la combinación de anticuerpos T1/C3 se desarrollaron contra prb sin marca,¹³ la cual fue purificada mediante electroforesis SDS-PAGE, y dializada extensivamente contra solución amortiguadora de fosfatos, antes de ser empleada como inmunógeno.^{13,15} Es probable que algún anticuerpo presente en el antisuero completo contra la proteína de fusión de maltosa tenga alguna afini-

dad serológica con proteínas tipo-estrés potencialmente presentes en las variedades de mandarina a nivel de campo. Esta posibilidad se basa en el hecho de que la absorción cruzada de los anticuerpos preparados contra la prb MBP con extractos de tejido de mandarina remedia el problema.³² No obstante que la hipótesis anterior requiere verificación, los resultados obtenidos pusieron en evidencia la efectividad de los anticuerpos prb T1/C3, para no producir reacciones inespecíficas en muestras colectadas a nivel de campo.

El CTV es un patógeno regulado en una gran cantidad de países, y anualmente se procesan millones de muestras de árboles a nivel mundial para detectar la presencia del CTV; lo anterior, con el objetivo primordial de eliminar focos de infección, ya sea en material de propagación de cítricos dentro de los programas de certificación, o para evitar la diseminación natural del virus y evitar la ocurrencia de epifitias futuras en el campo.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo proporcionan evidencia de que los anticuerpos desarrollados contra la prb del CTV son una opción viable para el muestreo masivo de plantas de cítricos. De acuerdo con nuestro sistema serológico de detección, los puntos clave son: 1) disponer de los cultivos de *Escherichia coli* transformados con el gen p25 de la cubierta proteica del virus; 2) purificar la correspondiente proteína recombinante sin marca, a través de electroforesis en geles de poliacrilamida, bajo condiciones desnaturalizantes con SDS, seguida de diálisis prolongada para eliminar los residuos de SDS de las porciones de geles conteniendo la prb antes de su uso como inmunógeno y, finalmente, 3) contar con un sistema eficiente para la producción y evaluación masiva de los anticuerpos desarrollados. Estos puntos pueden garantizar el abasto permanente de anticuerpos anti-CTV como base para las campañas permanentes de detección del CTV a nivel mundial. Actualmente existen en el mercado varios kits comerciales para la detección del CTV, la mayoría de ellos en los Estados Unidos, España, Italia y Suiza. No obstante que los kits

serológicos disponibles son eficientes para la detección del CTV, son relativamente caros y su costo se incrementa más cuando se deben importar a otros países. Adicionalmente, su disponibilidad no siempre es inmediata;¹⁴ todos estos factores, por ende, limitan su utilidad para el análisis masivo de muestras, especialmente en la citricultura de los países donde los kits de detección serológicos deben ser importados del extranjero.

Resumen

En el presente trabajo se reporta el desarrollo y uso de un sistema serológico para la detección del virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV), en el análisis masivo de muestras de cítricos, con base en la técnica ELISA, en la modalidad de doble sándwich indirecto (DASI), empleando anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante (prb) del gen p25 de la cubierta proteica del virus. El trabajo consistió en la evaluación de anticuerpos específicos prb anti-CTV desarrollados en cabras y conejos, a manera de un kit completo ELISA-DASI. La evaluación se llevó a cabo con tejido proveniente de plantas sanas de cítricos e infectadas por el CTV. La combinación de los anticuerpos prb de cabra T1 empleados como anticuerpos primarios (atrapantes de antígeno) para el tapizado de las placas y de conejo C3 empleados como anticuerpos intermedios (detección del antígeno), fueron eficientes para la detección del CTV presente en muestras de cítricos de una colección internacional de aislamientos del CTV de orígenes geográficos diversos, y se demostró con ello la capacidad de reconocer aislamientos del CTV que causan un amplio espectro de síntomas en diferentes hospedantes cítricos. Asimismo, la combinación de anticuerpos prb cabra T1/conejo C3 fue igualmente eficiente en la discriminación de plantas sanas y plantas infectadas por el CTV que los anticuerpos empleados por la Agencia de Erradicación de Tristeza de California (Central California Tristeza Eradication

Agency = CCTEA) empleados en el análisis masivo de muestras de cítricos, así como con un kit comercial disponible para la detección del CTV. Adicionalmente, se demostró la eficiencia de la combinación de los anticuerpos prb T1/C3 para el análisis masivo de muestras de cítricos colectadas dentro del programa regular anual de monitoreo del CTV llevado a cabo por la CCTEA. La evaluación incluyó el análisis de 41,195 muestras provenientes de 301 plantaciones comerciales de los distritos 1, 2 y 3 de California. Mediante el empleo de los anticuerpos prb T1/C3, se encontraron y eliminaron 26 árboles (0.063 %) infectados por el CTV. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que los anticuerpos desarrollados contra la prb del CTV se pueden utilizar como anticuerpos primarios e intermedios para, respectivamente, capturar y detectar antígenos del CTV en ensayos de ELISA, en la modalidad de doble sándwich indirecto.

Palabras clave: Aislamientos de virus, Densidad óptica, ELISA, Kits comerciales de detección.

Abstract

The present work reports the development and use of a serological system for the large scale detection of *Citrus tristeza virus* (CTV), on the basis of the double antibody sandwich indirect enzyme-linked immunosorbent assay (DASI-ELISA), by using antibodies specific for the recombinant coat protein (rCP) of the p25 gene of CTV. The work consisted of the evaluation of rCP CTV specific antibodies developed in goats and rabbits as a complete kit for the detection of the virus using healthy and CTV infected tissue. The combination of goat T1 used as primary (coating), and rabbit C3 as intermediate (detecting) rCP antibodies, reacted efficiently, with optical density (OD_{405}) values between 0.250 and 2.000 with samples from an international collection of diverse CTV. The CTV isolates tested cause a broad spectrum of disease syndromes in different citrus hosts. The OD_{405}

values for healthy tissue were less than 0.100. Likewise, the combination of goat T1/rabbit C3 rCP antibodies gave consistent results for CTV positive and negative sample discrimination when directly compared to the Central California Tristeza Eradication Agency (CCTEA) antibodies used for large-scale CTV detection, as well as a commercially available CTV serological detection kit. The combination of goat T1/ rabbit C3 rCP antibodies showed its suitability for large scale indexing with samples collected in commercial groves as part of the CCTEA's regular monitoring program. The evaluation included 41,195 samples from 301 commercial groves from Districts 1, 2, and 3. A total of 26 trees (0.063 percent) were found to be CTV positive using the T1/C3 rCP antibody combination. Results of this research provide evidence that rCP antibodies can be efficiently used for both capturing and detecting CTV antigens in double antibody sandwich indirect ELISA.

Keywords: Commercial detection kits, ELISA, Optical density, Virus isolates.

Agradecimientos

Este trabajo recibió apoyo financiero del Conacyt, Proyectos 032/95, 53074/2006, así como de la Universidad Autónoma de Nuevo León, proyecto Paicyt/UANL CN 311-00.

Referencias

1. Bar-Joseph, M., and Lee, R.F. 1989. Citrus tristeza virus. Descriptions of Plant Viruses No. 353 (No. 33 revised), Kew, Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute, 7 pp.
2. Bar-Joseph, M., and Malkinson, M. 1980. Hen yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. J. Virol. Methods 1:1-5.
3. Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D.,

- Moscovitz, M., Purcifil, D.E., Clark, M.F., and Loebenstein, G. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69:190-194.
4. Bar-Joseph, M., Filatov, V., Gofman, R., Guang, Y., Hadjinicolis, A., Mawassi, M., Gootwine, E., Weisman, Y., and Malkinson, M. 1997. Booster immunization with partially purified citrus tristeza virus (CTV) preparation after priming with recombinant CTV coat protein enhances the binding capacity of capture antibodies by ELISA. *J. Virol. Methods* 67:19-22.
 5. Bar-Joseph, M., Marcus, R., and Lee, R.F. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27:292-316.
 6. Batista L. 2001. Obtención y evaluación de un anticuerpo monoclonal para la detección del virus de la tristeza de los cítricos: aplicación en estudios epifititológicos. PhD Thesis. Universidad Central de Las Villas, Cuba.
 7. Batista, L., Peña, I., López, D., Casín, J.C., Velásquez, K., Torres, M.C., and León, Y. 2005. Management program for citrus tristeza in Cuba. pp. 404-406, in: Proc. 16th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. M.E. Hilf, N. Durán-Vila, M.A. Rocha-Peña (eds.). Riverside, California.
 8. Cambra, M., Camarasa, E., Gorris, M.T., Garnsey, S.M., and Carbonell, E. 1991. Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV specific monoclonal and polyclonal antibodies. pp. 38-45, in: Proc 11th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. R.H. Brlansky, R.F. Lee, and L.W. Timmer (eds.). Riverside, California.
 9. Clark, M.F., Lister, R.M., and Bar-Joseph, M. 1986. ELISA techniques. *Methods Enzymol.* 113:742-766.
 10. Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Paul, C., Hilf, M.E., Lee, R.F., Brlansky, R.H., Yokomi, R.K., and Hartung, J.S. 2005. Biological characterization of an international collection of Citrus tristeza virus (CTV) isolates. pp. 75-93, in: Proc. 16th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. M.E. Hilf, N. Durán-Vila, and M.A. Rocha-Peña (eds.). Riverside, California.
 11. Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M., and Henderson, C.T. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). pp. 39-50, in: Proc 11th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. P. Moreno, J.V. da Graça, and L.W. Timmer (eds.). Riverside, California.
 12. Gonsalves, D., Purcifil, D.E., Garnsey, S.M. 1978. Purification and serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 68:553-559.
 13. Iracheta-Cárdenas, M.M., Almeyda-León, I.H., Manjunath, K.L. Cevik, B., Niblett, C., Lee, R., and Rocha-Peña, M.A. 2002. Molecular cloning and expression of the p25 gene of two Mexican isolates of Citrus tristeza virus. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20:174-181.
 14. Iracheta-Cárdenas, M. M., Peña, del Río, M. A., y Rocha-Peña, M.A. 2005. Comparación de antiseros comerciales para la detección del virus tristeza de los cítricos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23:323-328.
 15. Iracheta-Cárdenas, M., Sandoval-Alejos, B.D., Román-Calderón, M.E., Manjunath, K.L., Lee, R.F., and Rocha-Peña, M.A. 2008. Production of polyclonal antibodies to the recombinant coat protein of Citrus tristeza virus and their effectiveness for virus. *J. Phytopathology* 156:243-250.
 16. Lee, R.F., McConnell, P., Manjunath, K.L., Cevik, B., Nikolaeva, O.V., Dekkers, M.G.H., and Niblett, C.L. 2002. The Citrus tristeza virus epidemic in Bog Walk Valley, Jamaica. pp. 95-101, in: Proc. 15th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. N. Durán-Vila, N., R. G. Milne, and J.V da Graça (eds.). Riverside,

- California.
17. Manjunath, K.L., Pappu, H.R., Lee, R.F., Niblett, C.L., and Civerolo, E.L. 1993. Studies on the coat protein genes of four isolates of citrus tristeza closterovirus from India: cloning, sequencing and expression. pp. 20-27, in: Proc 11th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. P. Moreno, J.V. da Graça, and L.W. Timmer (eds.). Riverside, California.
 18. Moreno, P., Ambrós, S., Albiachi-Martí, MR., Guerri, J., and Peña, L. 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* 9:251-268.
 19. Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Gumpf, D.J., Lee, R.F., and Garnsey, S.M. 1995. Production of polyclonal antisera to the coat protein of citrus tristeza virus expressed in *Escherichia coli*: application for immunodiagnosis. *Phytopathology* 85:691-694.
 20. Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Powell, C.A., Gumpf, D.J., Garnsey, S.M., and Lee, R.F. 1996. Mapping of epitopes for citrus tristeza virus specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments. *Phytopathology* 86:974-979.
 21. Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J., and Lee, R.F. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80:224-228.
 22. Polek, M.L. 2000. Permanent monitoring of citrus tristeza virus and suppression of the disease by tree removal: the case of California. *Hort. Mex.* 8:19-24.
 23. Polek, M., Gumpf, D.J., Wallen, C.M., and Riley, M.K. 2005. Biological characterization of naturally occurring Citrus tristeza virus strains in California citrus. pp. 68-74, in: Proc 16th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. M.E. Hilf, N. Durán-Vila, and M.A. Rocha-Peña (eds.). Riverside, California.
 24. Polek, M., Metheny, P., and Wallen, C. 2004. Dubious optical density readings in ELISA testing for Citrus tristeza virus in mandarin varieties of citrus. *Phytopathology* 94 (Supplement):S85 (Abstract).
 25. Riley, K., and Polek, M. 2000. Central California Tristeza Eradication Agency: Lab procedures and quality assurance manual. Central California Tristeza Eradication Agency. Tulare, California. 110p.
 26. Rocha-Peña, M.A., and Lee, R.F. 1991. Serological techniques for detection of citrus tristeza virus. *J. Virol. Methods* 34:311-331.
 27. Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., and Niblett, C.L. 1991. Development of a dot-immunobinding assay for citrus tristeza virus. *J. Virol. Methods* 34:297-309.
 28. Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Lastra R., Niblett, C.L., Ochoa-Corona, F.M., Garnsey, S.M., and Yokomi, R.Y. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in Caribbean and Central and North América. *Plant Dis.* 79:437-445.
 29. SAGARPA. 2004. Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 15 p.
 30. Tragon, M.L.P.N., Nikolaeva, O., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Muller, G.W., and Machado, M.A. 1997. Coat protein gene of a Brazilian isolate of the citrus tristeza virus: cloning, expression in *E. coli* and production of polyclonal antiserum. *Fitopatol. Bras.* 22:99-102.
 31. Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguel, J.G., Pérez de San Román, C., and Sanz, A. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use in diagnosis. *J. Gen. Virol.* 67:91-96.
 32. Yokomi, R.K., and Polek, M.L. 2007. Elevated

- background in DAS-I ELISA for the detection of Citrus tristeza virus in mandarin varieties. Programme and Abstract Book, 17th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. Adana Turkey October 22-26, 2007 (Abstract).
33. Yokomi, R.K., Polek, M.L., Satar, S., and Gottwald, T.R. 2002. An economic sampling protocol for locating Citrus tristeza virus reservoirs in a large area. pp. 54-59, in: Proc. 15th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. N. Durán-Vila, R.G. Milne, and J.V. da Graça (eds.). Riverside, California.

Recibido: 01 de agosto de 2010
Aceptado: 01 de septiembre de 2010