

## DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS POR ELISA DASÍ

### Fundamento de la técnica

La técnica inmunoenzimática ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se basa en la reacción entre los antígenos y sus anticuerpos específicos y se utilizan soportes rígidos para la fijación de éstos. Se conocen diversas variantes de esta técnica, siendo el ELISA sandwich de doble anticuerpo (DAS) y el sandwich de doble anticuerpo indirecto (DASI) las más usadas.

Estos métodos pueden ser aplicados para el análisis de un gran número de muestras. Se caracterizan por su alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía y permiten detectar el virus en plantas asintomáticas. A pesar de estas ventajas, tienen el inconveniente de que se requiere la preparación previa de extractos, lo que resulta laborioso y genera problemas de contaminación entre muestras, así como la posibilidad de liberar inhibidores vegetales.

### Procedimiento

1. **Tapizado:** Recubrir placas de poliestireno con una solución que contiene anticuerpos policlonales anti-CTV diluidos en tampón de fijación (0,015 M de  $\text{NaHCO}_3$  y 0,03 M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9,6). Incubar las placas en cámara húmeda durante 3 horas a  $37^\circ\text{C}$ .
2. **Lavado:** Desechar el contenido y lavar 3 veces con solución de lavado, PBS-T (0,15 M de NaCl, 0,015 M de  $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,05% de Tween 20) o AFT 0,5X (0,14 M de NaCl, 2,6 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 7,5 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,05% de Tween 20).
3. **Preparación de las muestras:** Cortar fragmentos de tejido de la muestra y añadir tampón de extracción (PBS-T + 1% PVP, pH 7) en proporción de 1:5 ó 1:10 (p:v). Macerar en un homogeneizador y dosificar en los pocillos. Colocar controles de referencia positivos y negativos en iguales dosis que las muestras problema. Incubar toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ .
4. **Lavado:** Como en el paso 2.
5. **Segundo anticuerpo:** Adicionar el anticuerpo monoclonal anti CTV diluido en el tampón de extracción. Incubar 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ .
6. **Lavado:** Como en el paso 2.
7. **Conjugado anti-especie:** Adicionar el anticuerpo anti-especie conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, diluido en tampón de extracción. Incubar 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ .
8. **Lavado:** Como en el paso 2.
9. **Revelado de la reacción:** Revelar con paranitrofenil fosfato de sodio disuelto en tampón sustrato (dietanolamina al 10 %, pH 9,8). Incubar a temperatura ambiente por 1-3 horas.
10. **Lectura de la placa:** La lectura de las placas se realiza en un lector de ELISA automático utilizando un filtro de 405 nm.
11. **Resultados:** Se consideran muestras positivas aquellas cuyo valor es superior al de 2 veces la media de los controles sanos.

En todos los pasos se dosifican en la placa 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de las soluciones correspondientes.