

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS POR INMUNOPRESIÓN-ELISA INDIRECTA

Fundamento de la técnica

La Inmunoimpresión ELISA (IIP-ELISA) es una versión simplificada de la técnica ELISA que evita el paso de preparación de extractos vegetales, lo que permite ampliar el número de muestras a procesar, así como eliminar la contaminación entre muestras y la posibilidad de liberar inhibidores vegetales. En esta técnica el antígeno se une a una membrana de nitrocelulosa con afinidad por las proteínas y la detección se realiza directa o indirectamente utilizando anticuerpos específicos. La IIP-ELISA permite la separación temporal de los procesos de toma y análisis de muestras debido a que se pueden conservar las membranas impresas por largos períodos, con resultados de alta confiabilidad, eficiencia y correlación con el ELISA. Estas ventajas han estimulado su utilización como sistema de diagnóstico en varios países.

Procedimiento

1. **Impresión de las muestras:** Cortar varetas o pecíolos de hojas en sus extremos con instrumentos que dejen superficies lisas. Presionar suavemente sobre una membrana de nitrocelulosa para obtener 2 impresiones de la muestra. Colocar impresiones de plantas infectadas y sanas que sirvan como controles de referencia. Dejar secar y conservar en un lugar seco.
2. **Bloqueo:** Bloquear con una solución de albúmina de suero bovino o leche descremada al 1% por 1 hora a temperatura ambiente. Descartar la solución una vez finalizada la incubación.
3. **Adición de los anticuerpos:** Adicionar los anticuerpos específicos para CTV diluidos en agua fisiológica tamponada (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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) con albúmina de suero bovino o leche descremada al 1 %. Incubar 1 hora a temperatura ambiente y descartar la solución.
4. **Lavado:** Se realizan 3 lavados consecutivos con 0,5X de agua fisiológica tamponada-Tween 20.
5. **Adición del conjugado anti-especie:** Adicionar el anticuerpo anti-especie marcado con la enzima fosfatasa alcalina, diluido en agua fisiológica tamponada con albúmina de suero bovino o leche descremada. Incubar 16 horas a temperatura ambiente y descartar la solución.
6. **Lavado:** Como en el paso 4.
7. **Revelado de la reacción:** Revelar con una solución de NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium y 5-bromo-4cloro-3-indolyphosphate) preparada con pastillas listas para usar disueltas en agua destilada. Incubar en oscuridad a temperatura ambiente por 15-20 minutos. Paralizar la reacción eliminando el sustrato y adicionando agua corriente. Secar las membranas sobre papel absorbente.
8. **Interpretación de los resultados:** Evaluar con una lupa o en un microscopio estereoscópico la presencia del virus por la formación de agregados de coloración púrpura en la zona correspondiente al floema de las impresiones.

En todos los pasos se añaden 10 mL de las soluciones correspondientes por cada membrana de aproximadamente 10 x 13 cm.