

DIAGNOSTICO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL CARDAMOMO
UTILIZANDO LA TECNICA INMUNOSORBENTE
ENZIMA CONJUGADA (ELISA)

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Ciencias Agrícolas

**BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

DIAGNOSTICO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL CARDAMOMO

UTILIZANDO LA TECNICA INMUNOSORBENTE

ENZIMA CONJUGADA (ELISA)

MARTIN DIEZ PESQUERA

Trabajo de investigación presentado para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el grado
académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas

Guatemala

1985

A la memoria de mi madre:

Margarita P. de Díez

A mi padre:

Anastasio Díez M.

A mis hermanos y sobrinos

A mis profesores

A todos los lasallistas

Vo.Bo.

ING Agr. Ricardo del Valle

(f) ~~Julio Roberto Tejada Castillo~~
Ms.Sc. Julio Roberto Tejada Castillo
Asesor

Tribunal:

(f) ~~Elvira G. de Mejía~~
Ingeniera Elvira González de Mejía
ING. Agr. MAVIA UELM.

(f) ~~Marco Tulio Urizar Moncrieff~~
Licenciado Marco Tulio Urizar Moncrieff
ING. Agr. JOSÉ JESÚS CHONNY.

(f) ~~Julio Roberto Tejada Castillo~~
Ms.Sc. Julio Roberto Tejada Castillo
ING. Agr. Ricardo del Valle.

Fecha de aprobación: 15 de febrero de 1985

25 MARZO

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo.

A los ingenieros Julio Roberto Tejada C. y Marco Tulio Urízar por su valiosa y desinteresada ayuda.

A mis compañeros de laboratorio, Dina Montúfar, Margarita de Mata, Hellen de Prentice, Sonia Ubico, Oscar Bonilla y Rolando Mejía por su colaboración.

A la Asociación de Productores de Cardamomo de Guatemala por haber proporcionado todo el material para la investigación.

A la Universidad del Valle de Guatemala por su colaboración y préstamo de equipo de laboratorio.

A todos los Hermanos de La Salle por su apoyo constante.

A Edin García, Oscar Azmitia, Rudy Villatoro, Benjamín Rivas, Licenciado Marco Urízar y a todas las demás personas que colaboraron en el presente estudio.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
A. El cultivo del cardamomo	3
1. Características botánicas	3
2. Ecología del cultivo	4
3. Importancia del cultivo	4
B. La enfermedad del mosaico del cardamomo	5
C. Técnicas serológicas	6
D. La técnica inmunosorbente enzima conjugada (ELISA)	7
1. Fundamentos de ELISA	9
2. Condiciones de ELISA	10
3. Análisis fotométrico de las muestras	10
III. MATERIALES Y METODOS	11
A. Reactivos	11
B. Procedimiento de la técnica ELISA	11
C. Purificación de la gama-globulina	13
D. Conjugación de la enzima con la gama-globulina	17
E. Preparación de la muestra para analizar	18

	Página
IV. RESULTADOS	19
A. Dilución de la gama-globulina	19
B. Dilución del antígeno	23
C. Dilución de la enzima conjugada	27
D. Especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo	27
E. Sensibilidad de la técnica	30
F. Maceración del tejido	30
G. Detección del VMCar en plantas sin síntomas clínicos	32
H. Determinación de la concentración de virus en la planta	32
I. Diagnóstico por análisis con espectrofotómetro	35
J. Purificación de la gama-globulina	35
K. Conjugación de la enzima con la gama-globulina	35
V. DISCUSION Y CONCLUSIONES	39
VI. APENDICE	43
VII. BIBLIOGRAFIA	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Escala para la evaluación visual de las muestras en la técnica ELISA	15
2	Diagrama de los pasos seguidos en el tratamiento de la muestra de la planta	33
3	Valores de absorbancia de los tratamientos para la estandarización de la técnica ELISA para la detección del VMCar	45
4	Análisis de varianza	46
5	Prueba de Duncan para los niveles de gama-globulina	47
6	Prueba de Duncan para los niveles de extracto de planta	47
7	Prueba de Duncan para los niveles de dilución de enzima conjugada	48
8	Prueba de Duncan para los tratamientos	48
9	Valores de absorbancia de los tratamientos para encontrar la dilución ideal de extracto de planta enferma.	50
10	Análisis de varianza	50
11	Prueba de Duncan para los tratamientos	51
12	Valores de absorbancia a 405 nm de los tratamientos de ELISA para el análisis por espectrofotómetro	52

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama esquemático de la secuencia de pasos en el método de ELISA	14
2	Diagrama de la distribución de <u>tratamientos</u> para ELISA	20
3	Diagrama de las diluciones de la gama-globulina a diferentes concentraciones del extracto de planta enferma	21
4	Diagrama de las diluciones de la gama-globulina a diferentes diluciones de la enzima conjugada	22
5	Diagrama de las diluciones del extracto de planta enferma a diferentes concentraciones de la gama-globulina	24
6	Diagrama de las diluciones del extracto de planta enferma a diferentes concentraciones de la enzima conjugada	25
7	Diagrama de las diluciones de extracto de planta enferma	26
8	Diagrama de las diluciones de enzima <u>conjugada</u> a diferentes concentraciones de gama-globulina	28
9	Diagrama de las diluciones de la enzima conjugada a diferentes concentraciones del extracto de planta enferma	29
10	Diagrama de las diferentes diluciones del extracto de planta enferma	31
11	Grupos de plantas sin síntomas clínicos de la enfermedad producida por el VMCar y porcentaje de plantas de cada grupo	34
12	Resultados de la purificación de la gama-globulina	36

RESUMEN

La técnica de "doble sandwich" inmunosorbente enzima conjugada (ELISA), es un método excelente y de alta sensibilidad para detectar de manera cualitativa y cuantitativa diversos virus de plantas.

El virus del mosaico del cardamomo (VMCar) fue diagnosticado utilizando la técnica ELISA cuya sensibilidad se manifestó hasta en diluciones de 1:1,000 de planta enferma.

El antígeno fue detectado en plantas enfermas en diluciones desde 1:10 hasta 1:1,000 con concentraciones de 5 mcg/ml de gama-globulina disuelta en una solución de carbonato de sodio a pH 9.6 y una dilución de enzima conjuga da con gama-globulina de 1:400 disuelta en una solución de PBS-Tween más 20% de PVP y 2% de ovalbúmina.

En el diagnóstico de VMCar por análisis con espectrofotómetro, se decidió que para determinar el valor de absorbancia a partir del cual puede considerarse que una planta está o no atacada por el patógeno, debe sumarse el valor de 0.08 a la media de las lecturas de absorbancia a 405 nm, de los controles negativos de la prueba.

I. INTRODUCCION

El Cardamomo (Elettaria cardamomum) es uno de los cultivos que en los últimos años ha ido adquiriendo popularidad entre los agricultores guatemaltecos debido a su alta rentabilidad.

En 1920, se introdujo en el país este cultivo y gracias a las condiciones ideales de clima y suelo de varias de sus regiones, pronto se extendió por diversos puntos de la República. Una muestra de ello es que de nueve mil quinientas hectáreas de cardamomo cultivadas en 1975 se aumentó a dieciseismil quinientas en 1979.

Desde el punto de vista económico, además de ser una fuente de trabajo para muchas familias de escasos recursos, y gracias a la alta demanda que el producto tiene y a los elevados precios que ha adquirido en el exterior, es una fuente de ingresos para muchos agricultores y de divisas para el país.

En 1975 aparece en la finca La Florida, El Palmar, Quezaltenango, Guatemala, una enfermedad conocida como mosaico del cardamomo, que se diseminó por toda la costa sur y está causando serios daños en las plantaciones cardamomeras. Hasta este momento no se ha realizado ningún estudio para evaluar los daños causados por esta enfermedad y aunque en los años siguientes a su aparecimiento los daños no se hicieron sentir en la producción, hoy algunos agricultores estiman que las pérdidas llegan en algunos casos hasta el 60 ó 70%. Dado que la enfermedad se ha extendido por todo el país, amenaza con terminar con el cultivo si no se toman medidas inmediatas y eficaces. Consciente de ello, la Asociación de Productores de Cardamomo (APROCAR) inició gestiones con el Dr. Denis Gonsalves, de la Universidad de Corneell

E.U.A., para iniciar el estudio del virus del mosaico del cardamomo (VMCar) agente causante de la enfermedad.

En febrero de 1982 APROCAR solicitó la colaboración de la Universidad del Valle de Guatemala, con la que firmó un convenio, para que esta institución hiciera las investigaciones necesarias con el fin de llegar a conocer diversos aspectos del patógeno que causa la enfermedad.

Actualmente la única forma de detectar la enfermedad es a través de los síntomas clínicos que se observan en la planta infectada. No obstante hay muchas plantas atacadas que no presentan síntomas y si esta situación se da en plantas de semillero que deben ir al campo definitivo, el problema se torna de dimensiones incalculables. De ahí que una de las primeras tareas es la de buscar una técnica apropiada para detectar la presencia del VMCar y posteriormente realizar otro tipo de trabajos para combatir la enfermedad,

El presente trabajo tiene como objetivo el de estandarizar la técnica Inmunsorbente enzima conjugada (ELISA) para diagnosticar en forma rápida, eficiente y a bajo costo la presencia del VMCar.

Hipótesis: El virus del mosaico del cardamomo puede ser diagnosticado en forma cualitativa y cuantitativa utilizando la técnica inmunsorbente enzima conjugada (ELISA) si se aplican concentraciones adecuadas de gama-globulina anti-virus del mosaico del cardamomo, de antígeno y de enzima conjugada con gama-globulina.

II. REVISION DE LITERATURA

A. El cultivo del cardamomo

1. Características botánicas. El cardamomo (Elettaria cardamomum) pertenece a la familia de las zingiberáceas. Es una planta perenne, de aproximadamente 2.50 a 3.50 m de altura, provista de un rizoma tuberoso horizontal (33). Este rizoma desarrolla de ocho a veinte tallos-hojas. Las hojas son envainadoras, lineales, lanceoladas y dispuestas en el tallo en forma alterna, presentando nervaduras a lo largo de la lámina foliar; su longitud es de aproximadamente cincuenta centímetros y su anchura de cuatro a seis centímetros (2, 7).

El rizoma produce tallos florales de unos noventa centímetros de altura y presentan una tendencia a recostarse horizontalmente. Las inflorescencias que se forman están dispuestas en panículas (24). Las flores son hermafroditas, irregulares y con brácteas de color blanco a verde pálido y violeta en el centro, de 2.5 a 3.8 mm de diámetro (25).

Enríquez (18) señala que la corola es tubular con tres pétalos, uno de los cuales sobresale por ser el más grande. El cáliz con tres sépalos es doble y externo, cilíndrico y con dos lóbulos, con cuatro divisiones externas y tres internas donde se encuentran los óvulos.

El fruto es una cápsula indehisciente con tres lóculos, de diez a veinte milímetros de largo y de cinco a diez milímetros de diámetro. Posee tres celdas y tres segmentos de color verde amarillento en estado maduro. En cada celda se desarrollan de tres a siete semillas de forma irregular, angulosas, duras, de color pardo y superficie áspera con un surco en todo lo largo y una pequeña envoltura delgada, incolora y membranosa de sabor picante (25, 18, 24).

2. Ecología del cultivo. El cardamomo es un cultivo tropical que requiere una temperatura entre los 20 y 25°C y una precipitación pluvial de 2,000 a 3,000 mm bien distribuidos durante todo el año. Se desarrolla perfectamente en altitudes que van de los 700 a los 1,500 metros sobre el nivel del mar y con una humedad relativa de 70 a 80% (25). Los suelos aconsejables son los arcillo-arenosos sueltos y bien drenados con abundante materia orgánica y ricos en elementos minerales.

3. Importancia del cultivo. Son cada día más los usos que se dan a los productos obtenidos de la planta de cardamomo. En la India se utiliza para preparar diversos platos mientras que en Europa y Estados Unidos de América se utiliza para la industria de alimentos envasados. La industria farmacéutica lo aprovecha para la fabricación de medicamentos estimulantes de las funciones gastrointestinales. El aceite extraído se emplea para aromatizar cigarrillos y preparar perfumes, cosméticos, licores y otras bebidas. En Arabia preparan con el fruto una bebida el "Gahwa".

Desde el punto de vista económico, según los últimos datos proporcionados por el Banco de Guatemala (25), la extensión cultivada ha aumentado de nueve mil quinientas hectáreas cultivadas en 1975 a dieciseis mil quinientas en 1979. Ello es un indicio de la aceptación que el cultivo ha tenido entre los agricultores. Esto ha significado un aumento en los ingresos para muchos agricultores y de divisas para el país además de ser una fuente de trabajo para muchas familias de escasos recursos económicos.

En 1978 se exportaron dos mil toneladas métricas que significaron un ingreso de cerca de treinta y un millones de quetzales, colocándose por su valor, entre los tres principales productos de exportación del país situándose detrás del café y algodón (25).

B. La enfermedad del mosaico del cardamomo

Una de las principales enfermedades del cardamomo y la que más pérdidas ha causado en las diversas regiones cardamomeras de Guatemala, es la enfermedad conocida con el nombre de mosaico del cardamomo. El agente causante de la enfermedad es un virus conocido con el nombre de virus del mosaico del cardamomo (VMCar). La enfermedad aunque parece haber existido desde hace mucho tiempo, su descubrimiento por primera vez en Kanara Spice Gardens, la India, es relativamente reciente. En 1975, Flores (20), descubre en Guatemala en la finca La Florida, El Palmar, Quetzaltenango, una enfermedad cuyos síntomas eran parecidos a los de la enfermedad del mosaico del cardamomo conocida en la India como "kate". En un principio los daños causados por la enfermedad en los campos de la costa sur de Guatemala, no se hicieron sentir mucho, por lo que hasta se pensó que se trataba de otro tipo de mosaico del cardamomo, distinto al descubierto en la India. Pronto la enfermedad se extendió por todo el país comenzando a hacer estragos en las plantaciones.

Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen como una clorosis general en las hojas más jóvenes tomando un color amarillo o verde claro. Es característica la presencia de unas rayas o estrías paralelas de color verde oscuro sobre fondo claro que cubren toda la hoja desde la vena principal hasta el margen formando el patrón característico de mosaico. Cuando la planta joven es atacada, toma un porte achaparrado y no llega al alcanzar su tamaño normal mientras que su producción disminuye considerablemente. En la planta adulta, los primeros síntomas aparecen en las hojas más jóvenes. La proliferación de hijos es mayor pero su crecimiento no es erecto sino que se curvean hasta que las hojas tocan el suelo. Las ramas se marchitan y finalmente la planta muere (40, 20),

C. Técnicas serológicas

Entre las técnicas modernas para el estudio del virus están las basadas en la serología. A través de ellas se puede no solamente detectar la presencia del virus, aun en plantas sin síntomas, sino también cuantificarlo.

Las reacciones serológicas son el resultado de una combinación específica entre antígeno y anticuerpo. El antígeno se define como una sustancia que reacciona en forma específica con un anticuerpo determinado. Se han descrito muchos tipos de anticuerpos pero el más importante en la serología de los virus de plantas es la gama-globulina Ig G. Cada molécula del anticuerpo se caracteriza por tener dos superficies inmuoactivas idénticas, mientras que las partículas de virus pueden tener varios tipos de superficies de inmuoactividad distinta. Cuando las partículas de virus y los anticuerpos específicos hacen contacto bajo condiciones propicias, un punto inmuoactivo de una molécula del anticuerpo se adhiere a su punto antigénico específico sobre una partícula de virus y el otro punto activo se adhiere al mismo tipo de punto antigénico de otra partícula de virus uniendo así a las dos partículas (21, 23).

Entre las principales pruebas serológicas tenemos: a) la prueba de precipitación en tubos, b) la prueba de microprecipitación en placas, c) la prueba de precipitación en portaobjetos, d) la prueba de doble difusión en agar, y e) la prueba de precipitación de anillo de interfase.

Hasta en los últimos años los métodos serológicos o inmunológicos fueron casi desconocidos por la agricultura. Muchos de los esfuerzos realizados para usarlos fallaron a causa de que dichos métodos resultaron impracticables por el alto costo que significaban o por la experiencia técnica

que requerían, ello hizo que estos métodos no pudieran desarrollarse en gran escala en el campo agrícola. Los primeros pasos en este campo fueron dados por Derrick (15) al desarrollar una nueva técnica serológica llamada immuno sorbent electron microscopy.

D. La técnica inmunosorbente enzima conjugada (ELISA)

En 1977 Voller y colaboradores, Clarck y Adams (41, 11) adaptan la técnica inmunosorbente enzima conjugada (Enzyme-linked immunosorbent assay) que comúnmente se abrevia ELISA, para la detección cuantitativa de los virus de plantas (17).

Estudios iniciales con el virus del mosaico arábigo y virus del ciruelo indicaron que 1-10 nanógramos por mililitro, de virus puede ser detectado. Posteriormente, estudios más detallados realizados por Clark y sus colegas, determinaron las condiciones óptimas para la realización de tales ensayos y probaron en sus estudios iniciales que el virus de la mancha clorótica del ciruelo y otros virus pueden ser fácilmente detectados y analizados (1, 11, 12, 5, 39).

A excepción del radioinmunoensayo, todas las otras técnicas muestran una sensibilidad menor que la microscopía electrónica en la detección del virus. No obstante el radioinmunoensayo presenta dificultades de otra índole tales como la necesidad de un contador de centelleo, el empleo de radioisótopos y la limitada duración del reactivo marcado (37).

La sensibilidad de la técnica ELISA ha sido comparada con la técnica radioinmunoensayo en cuanto a su sensibilidad. Sobre ella, ofrece grandes ventajas tales como, su realización no requiere de aparatos costosos ni de tecnología complicada, las muestras a analizar no requieren de manipulación es-

pecial, su costo es sumamente bajo y ofrece la posibilidad de analizar un gran número de muestras en poco tiempo y la aplicación no requiere de grandes conocimientos científicos.

Clarck (10), señala tres características fundamentales de ELISA. a) Habilidad para detectar patógenos en plantas aun cuando éstos se encuentren en una concentración mucho menor de la requerida para los otros métodos clásicos de inmunoprecipitación. b) Capacidad para detectar antígenos de muy diferente tamaño y morfología. c) Aptitud para proporcionar datos cuantitativos de la presencia de virus. Característica ésta que permite obtener medidas precisas de la ocurrencia y distribución de un antígeno específico y de patógenos de plantas.

Simhon y colaboradores, 1978 (36), en su estudio para diagnosticar rotavirus en niños con diarrea, demostraron la mayor eficiencia de ELISA sobre la microscopía electrónica en la detección de virus. En todos los casos estudiados, ELISA superó a la microscopía electrónica en un 5.5% de casos detectados.

Actualmente el potencial de la técnica ELISA para proporcionar datos, ha sido utilizada para varios propósitos. Entre los virus estudiados están: virus de la tristeza de los cítricos, el del mosaico del enanismo amarillo de la cebada, el virus de la soya, de la papa, del pepino, del tomate, de la vid, del maíz, el virus de las cucurbitáceas y otros muchos que causan daños significativos en plantas de importancia económica (6, 29, 30, 31, 8, 14, 22, 35, 34). Se ha aplicado también la técnica para encontrar huéspedes alternos de distintos virus así como para el estudio de transmisores de estos patógenos (13).

Recientemente la aplicación de ELISA en el campo de la agronomía se ha extendido al estudio de bacterias que pertenecen a los géneros Corynebacterium, Rhizobium y Spiroplasma (12, 28). Esto hace pensar en el promisorio futuro que ELISA tiene en el campo de la fitopatología.

1. Fundamentos de ELISA. La técnica ELISA llamada también de "doble sandwich" se fundamenta en los siguientes procesos: los anticuerpos presentes en la gama-globulina, en condiciones apropiadas de pH se adhieren a la superficie de polivinilo de las bandejas de "Microtiter". Sobre el anticuerpo adsorbido se agrega una solución con antígeno llevándose a cabo una reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente se agrega un conjugado de gama-globulina con fosfatasa alcalina (enzima) que se adhiere al antígeno que había quedado adherido anteriormente al anticuerpo (11, 40).

Finalmente se agrega un sustrato adecuado a la enzima y la hidrólisis de éste por la fosfatasa-alcalina produce un color amarillo fácilmente apreciable a la vista. La presencia de color amarillo dependerá de si la reacción se ha realizado o no. Una reacción positiva dará coloración amarilla e indicará la presencia de antígeno en la muestra y una reacción negativa no dará coloración e indicará la ausencia de antígeno en la muestra estudiada. La reacción de enzima conjugada es proporcional a la cantidad de antígenos adheridos a la gama-globulina, de ahí que la intensidad de color amarillo al hidrolizarse la fosfatasa alcalina permitirá medir cuantitativamente la presencia de antígeno en la muestra por medio de espectrofotometría.

El conjugado gama-globulina con fosfatasa-alcalina tiene gran importancia. La reacción que se lleva a cabo es fácil de desarrollar y cuantificar.

El glutaraldehído que se agrega a la gama-globulina conjugada con la fosfatasa-alcalina, actúa como agente condensante (3).

La Fig. 1 nos muestra los principios generales en los que se basa la técnica ELISA.

2. Condiciones de ELISA. A medida que el interés por la técnica ELISA, para ser aplicada a distintos propósitos aumenta, se hace necesario estandarizarla para cada uno de ellos. Dos aspectos técnicos deben ser considerados, a) las concentraciones ideales de antisuero y antígeno, b) las condiciones experimentales y procedimientos analíticos (10).

Las concentraciones de antisuero y antígeno deben estar en proporciones adecuadas para que ocurra el precipitado. Un exceso de uno u otro ingrediente pueden inhibir la reacción. Es sabido que los antígenos pequeños, como es el caso de muchas proteínas de plantas, forman precipitados a concentraciones menores que las de antígenos grandes. Concentraciones de sales, pH inapropiado y la presencia de otros materiales pueden inhibir la reacción (21).

3. Análisis fotométrico de las muestras. Frecuentemente un análisis visual de los resultados de ELISA pueden ser suficientes para decidir si la reacción es positiva o negativa, sin embargo, en muchos casos dada la incertidumbre de la reacción será necesario acudir a un análisis fotométrico de las muestras para tomar una decisión más objetiva. El problema radica entonces en decidir el nivel o valor de absorbancia a partir del cual se debe considerar la reacción positiva o negativa.

Clarck (10) cree que lo más recomendable para determinar el nivel de decisión es tomar dos o tres desviaciones estándar sobre la media de los valores de absorbancia de las muestras negativas.

III. MATERIALES Y METODOS

A. Reactivos

Para desarrollar la técnica de ELISA se necesitan los siguientes reactivos.

1. Suero de conejo anti-virus del mosaico del cardamomo. El antisuero ha sido producido por el Dr. Gonsalves, inyectando conejos con virus purificado de las plantas de cardamomo infectadas con el VMCar. Este suero es la base para aislar la gama-globulina.

2. Suspensión de material macerado de plantas de cardamomo. Partes de plantas infectadas con el mosaico del cardamomo son maceradas en una solución de buffer de extracción.

Los otros reactivos son los descritos por Clarck y Adams para el desarrollo de la técnica ELISA (11).

B. Procedimiento de la técnica ELISA

Los pasos seguidos al aplicar la técnica ELISA son en líneas generales los descritos por Clarck y Adams con las modificaciones del presente estudio (11).

1. Primer paso. En cada uno de los noventa y seis pocillos en "U" de las bandejas de "microtiter", se depositan 0.20 ml de una solución de 5 microgramos por mililitro (mcg/ml) de gama-globulina de conejo anti-VMCar diluïdos en un buffer de carbonato de sodio a pH 9.6. Las bandejas se incuban por un período de 4 a 6 horas a 37°C, tiempo suficiente para que los anticuerpos se adhieran a la superficie de los pocillos de poliestireno. La bandeja es lavada tres veces consecutivas con PBS-Tween, dejando entre cada lavado tres minutos, para eliminar los anticuerpos que no se adhieren al poliestireno y otros materiales extraños.

2. Segundo paso. Sesenta de los pocillos de la bandeja son llenados con 0.20 ml de una suspensión de extracto de las plantas de cardamomo a investigar, supuestamente infectadas por el VMCar. La suspensión es utilizada en una dilución de 1:25, es decir, un gramo de material a estudiar en 25 ml de buffer de extracción. Como controles se usaron 36 pocillos, doce sirven de control negativo y son llenados con 0.20 ml de una suspensión de extracto de planta libre del VMCar, en una dilución de 1:25. Otros doce sirven de control positivo y son llenados con 0.20 ml de una suspensión de extracto de planta con presencia de VMCar, en una dilución de 1:25. Finalmente los doce pocillos restantes son llenados con 0.20 ml de buffer de extracción y sirven como control de referencia. Las bandejas se incuban a 6°C por 12 horas, tiempo durante el cual se realiza la primera reacción antígeno-anticuerpo, en donde el antígeno es atrapado por los anticuerpos que en el paso anterior habían quedado adheridos a la superficie de la placa de poliestireno. Al término del período de incubación, las bandejas, nuevamente son lavadas cuatro veces para eliminar los restos de extracto de planta y los antígenos no adheridos en la reacción antígeno-anticuerpo.

3. Tercer paso. Cada uno de los pocillos son llenados con 0.20 ml de gama-globulina de conejo anti-VMCar, conjugada con fosfatasa-alcalina. Nuevamente se incuban las bandejas a 30°C por un período de cuatro horas. Durante este tiempo se lleva a cabo una nueva reacción antígeno-anticuerpo, quedando constituido el "doble sandwich". Las bandejas son lavadas tres veces con PBS-Tween como en los pasos anteriores.

4. Cuarto paso. Los pocillos son llenados con 0.25 ml de sustrato fresco de 2-nitrofenil fosfato en solución de buffer de dietanola-

mina a pH 9.8 a razón de 1 mg/ml. Se incuban las bandejas a temperatura ambiente durante una hora o más. En los pocillos en los que la fosfatasa-alcalina está presente se realiza una reacción enzimática positiva con descomposición del sustrato y se desarrolla un color amarillo de mayor o menor intensidad indicando la presencia de virus en la muestra de planta. En los pocillos en los que la fosfatasa-alcalina no está presente no se lleva a cabo reacción alguna por lo que no aparece coloración, así como tampoco en los controles negativos y en control de referencia que nos indica la ausencia del VMCar en la muestra. Cuando la coloración en los pocillos es suficiente y antes de que aparezca coloración en el control de referencia y controles negativos, la reacción enzima-sustrato se detiene con una solución de NaOH al 3M.

En forma visual se realizan las evaluaciones necesarias de las muestras utilizando la escala presente en el Cuadro 1 o con ayuda de espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm se determina la absorbancia de las muestras.

C. Purificación de la gama-globulina

El método seguido para la purificación de la gama-globulina es esencialmente el descrito por Clarck y Adams (11). A un mililitro de antisuero se añaden nueve mililitros de agua destilada. Gota a gota se agregan diez mililitros de una solución saturada de sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, con el fin de separar las globulinas de la albúmina. Se deja en reposo de treinta a sesenta minutos a temperatura ambiente y se centrifuga durante diez minutos a 3,500 r.p.m. El líquido sobrenadante se desecha y el precipitado se disuelve en dos mililitros de 0.5 PBS a pH 7.4,

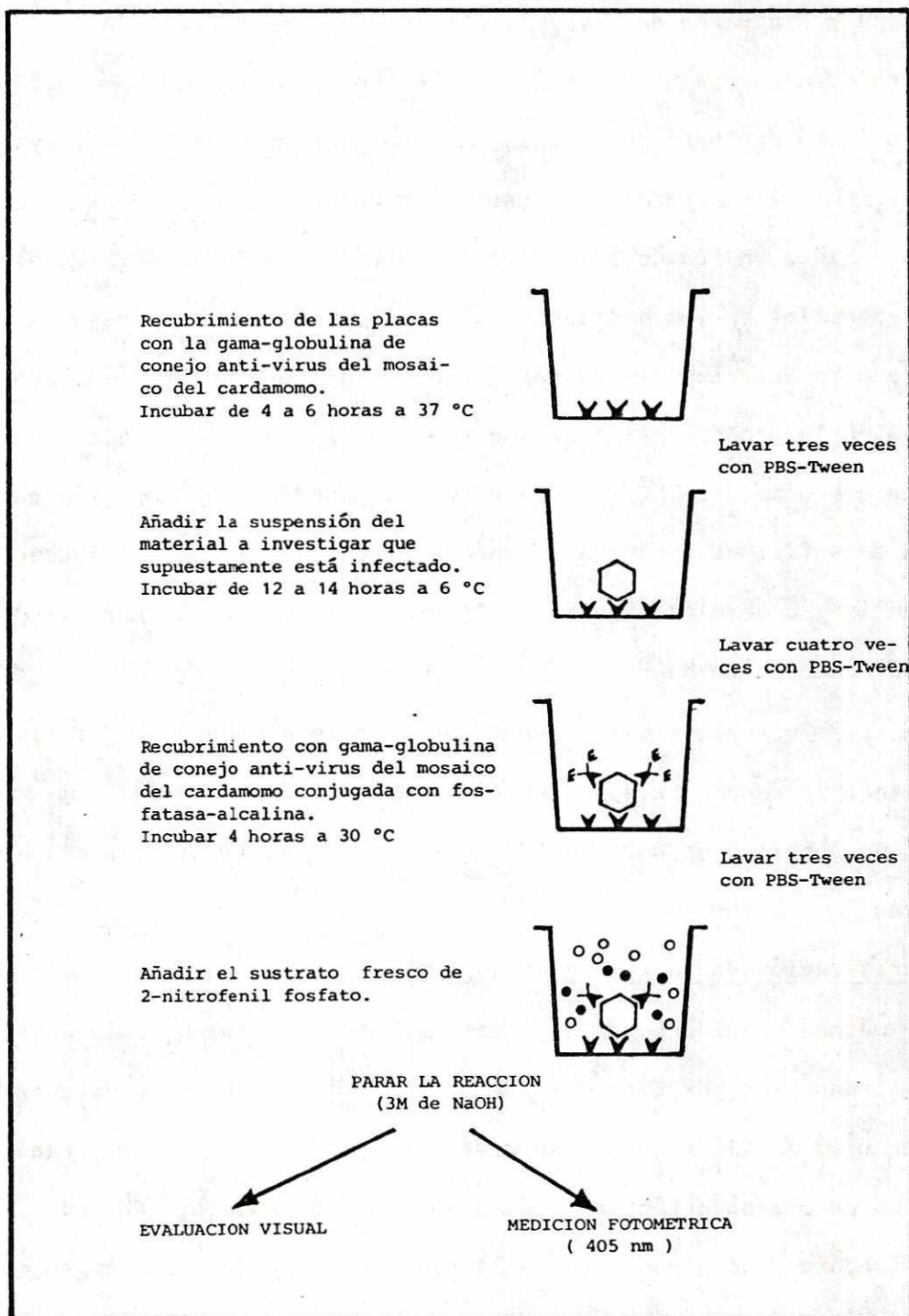


Fig. 1. Diagrama esquemático de la secuencia de pasos en el método de ELISA.

Cuadro 1. Escala para la evaluación visual de las muestras en la técnica de ELISA.

<u>Clave</u>	<u>Tipo de coloración</u>
++	Color amarillo intenso
+	Color amarillo claro
+ -	Coloración dudosa
-	Ausencia de coloración

Para preparar la membrana de diálisis se utiliza un beaker con agua destilada, donde se coloca una tira de la membrana de diálisis de unos veinte centímetros de largo, durante diez minutos de modo que las capas de la membrana puedan ser separadas. Se saca el agua y en uno de los extremos se hace un nudo teniendo cuidado al hacerlo para no dañar la membrana. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se toma la solución de gama-globulina que anteriormente se había disuelto en 0.5 PBS y se deposita en el interior de la membrana y se sella con un nudo en la parte superior cuidando de no dañar la membrana.

La membrana de dializar, con la solución de gama-globulina, se coloca en un beaker de 500 ml y se sujeta a las paredes con cinta adhesiva. Se agregan 500 ml de 0.5 PBS, que es cambiado cada cuatro horas y se dializa durante doce horas a una temperatura de 4°C con agitación constante. El dializado se saca de la membrana con ayuda de pipeta Pasteur y se coloca en un tubo de ensayo debidamente identificado, para ser guardado en refrigeración a 4°C.

Para preparar la columna de la purificación de la gama-globulina, se toma Dietilaminoetil celulosa (DEAE) disuelto en etanol al 28%, se agita y se colocan ocho mililitros en un frasco de treinta mililitros. Se agrega agua destilada de 10 a 15 ml, y se inicia el lavado del DEAE agitando en espiral. Se deja estabilizar durante diez minutos hasta que el agua se aclara y se desecha. El proceso se repite diez veces lavando con agua destilada y tres más con 0.5 PBS.

Para equilibrar la columna se echa agua en ella y se deja caer por el capilar hasta que no aparezcan burbujas en la pared de la columna y el capilar. Se humedece la columna con 0.5 PBS y se coloca el DEAE en la misma

tratando de ponerlo todo al mismo tiempo. Seguidamente con una pipeta de Pasteur se lavan las paredes de la columna con 0.5 PBS y se deja en reposo. Antes de iniciar el lavado de la columna se mide el pH del 0.5 PBS. Se llena con 0.5 PBS y este buffer se drena por el capilar. Se mide el pH del eluido hasta el momento en el que el pH del eluido sea igual al del 0.5 PBS, momento en el cual la columna está equilibrada. Se extrae todo el 0.5 PBS de la columna hasta que el menisco esté en la superficie del DEAE. Cuidadosamente se echa la gama-globulina en la columna, sin disturbar el DEAE. Se llena la columna con 0.5 PBS y se extraen trece fracciones de un mililitro. Cada una de ellas es colocada en un tubo de ensayo y posteriormente se miden con un espectrofotómetro a 280 nm para obtener una curva con las lecturas de absorbancia de cada una de las fracciones utilizando como blanco el 0.5 PBS.

D. Conjugación de la enzima con la gama-globulina

Para la conjugación de la enzima con un volumen de la solución de fosfatasa alcalina que contenga la gama-globulina, se toma un volumen de la solución de fosfatasa-alcalina que contenga 2,500 unidades internacionales de actividad enzimática de fosfatasa-alcalina y se coloca en un tubo de precipitado, se centrifuga durante diez minutos a 3,000 r.p.m. El líquido sobrenadante se desecha y el precipitado se disuelve en una solución de gama-globulina con PBS en una concentración de un miligramo por mililitro. La solución se coloca en membrana de diálisis y se dializa tres veces para remover el exceso de electrolitos, siguiendo el mismo procedimiento que para la purificación de la gama-globulina. Al terminar la diálisis se coloca el dializado en un tubo de ensayo y se agrega glutaraldehído fresco hasta llegar a una concentración final de 0.06%. Se incuba durante cuatro horas a temperatura

ambiente hasta que aparezca un color blanco turbio. Se vuelve a dializar tres veces más en 500 ml de 0.5 PBS siguiendo el mismo procedimiento anterior, con el fin de remover el glutaraldehído en exceso. Al dializado final se agrega albúmina de suero bovino o de huevo en concentración de cinco miligramos por mililitro y se guarda en tubos de silicón a 4°C.

E. Preparación de la muestra para analizar

Las muestras para ser analizadas se toman de material de distintas partes anatómicas de una planta de cardamomo con síntomas o sin ellos y se maceran con un buffer de extracción en relación de 1:25, es decir, un gramo de la muestra se macera con 25 ml de buffer de extracción PBS-Tween más 2% de Polivinilpirrolidone (PVP 40). El PVP tiene la función de estabilizar el antígeno y neutralizar efectivamente compuestos tales como polifenol oxidasas y taninos (11, 16, 19, 26, 32). El macerado es filtrado con una tela de gasa para facilitar el trabajo de pipeteo.

IV. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluaron los siguientes aspectos que tienden a la estandarización de la técnica ELISA para el estudio del VMCar.

A. Dilución de la gama-globulina

Para determinar la concentración ideal de la gama-globulina que se debe usar al aplicar la técnica ELISA, se evaluaron tres diluciones de la gama-globulina en buffer para cubrir placas. Las dosis probadas fueron: 10 mcg/ml, 5 mcg/ml y 1 mcg/ml. Estas dosis se confrontaron con cuatro diluciones de extracto de planta enferma: 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000 y con cuatro diluciones de enzima conjugada, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:3200. El diseño empleado en el experimento es un factorial 3 x 5 x 4 incluyendo un control negativo de extracto de planta sana con la distribución de los tratamientos que se observa en la Fig. 2.

El experimento fue sometido a la técnica ELISA según la metodología anteriormente descrita. Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. 3 y 4. Las mediciones fueron hechas con espectrofotómetro a 405 nm y los datos están dados en absorbancia. El experimento fue realizado en triplicado y con los datos obtenidos se hizo el análisis de varianza para determinar los efectos entre las diversas variables evaluadas, (Apéndice cuadro 5).

Se puede ver claramente, tanto en las gráficas como en los valores de absorbancia obtenidos en las mediciones (Fig. 2) que la dilución de 5 mcg/ml es la que mejor trabaja para todos los tratamientos, tanto en relación con el extracto de planta enferma como de la enzima. Una dilución de 10 mcg/ml da respuestas satisfactorias pero no tan claras y la dilución de 1 mcg/ml es poco clara y en la mayoría de los casos no hay respuesta positiva.

		CONCENTRACION DE LA GAMA-GLOBULINA mcg/ml											
		10				5				1			
DILUCION DEL EXTRACTO DE PLANTA	1:10	0.33	0.33	0.45	0.10	0.67	0.81	0.32	0.06	0.31	0.29	0.12	0.17
	1:100	1.10	0.40	0.62	0.13	1.48	0.64	0.47	0.12	0.25	0.19	0.09	0.02
	1:1000	0.49	0.30	0.32	0.08	0.60	0.30	0.25	0.07	0.20	0.13	0.07	0.02
	1:10000	0.13	0.11	0.07	0.02	0.17	0.09	0.08	0.02	0.02	0.05	0.04	0.07
	Cont.Neg.	0.03	0.02	0.01	0.01	0.03	0.02	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02
	Buffer	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		1:200				1:400				1:800			
		1:200	1:400	1:800	1:3200	1:200	1:400	1:800	1:3200	1:200	1:400	1:800	1:3200
		DILUCION DE LA ENZIMA CONJUGADA											

Fig. 2. Diagrama de la distribución de tratamientos para ELISA.

Datos de lectura de absorbancia a 405 nm de los tratamientos.

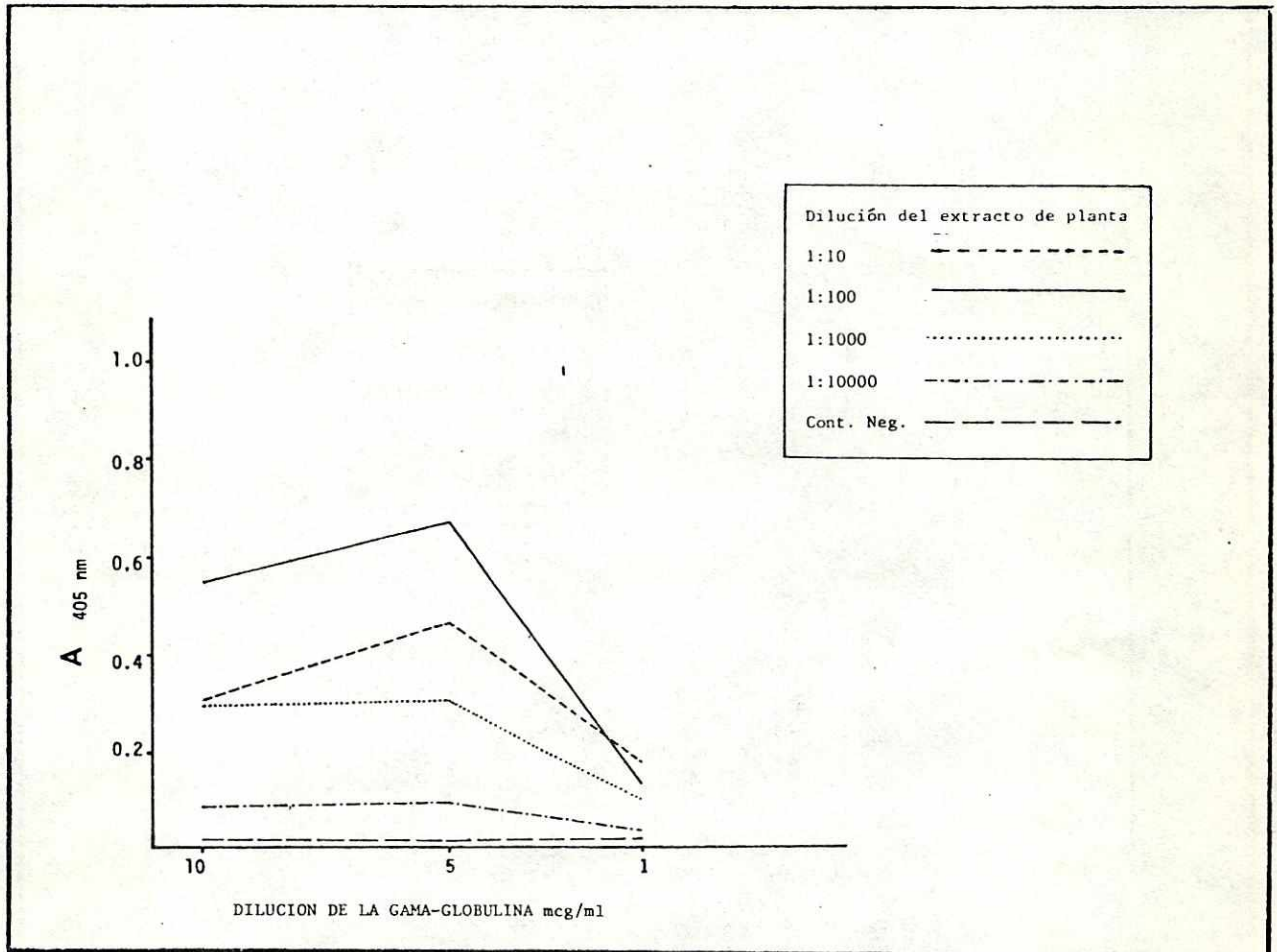


Fig. 3. Diagrama de las diluciones de la gama-globulina a diferentes concentraciones del extracto de planta enferma.

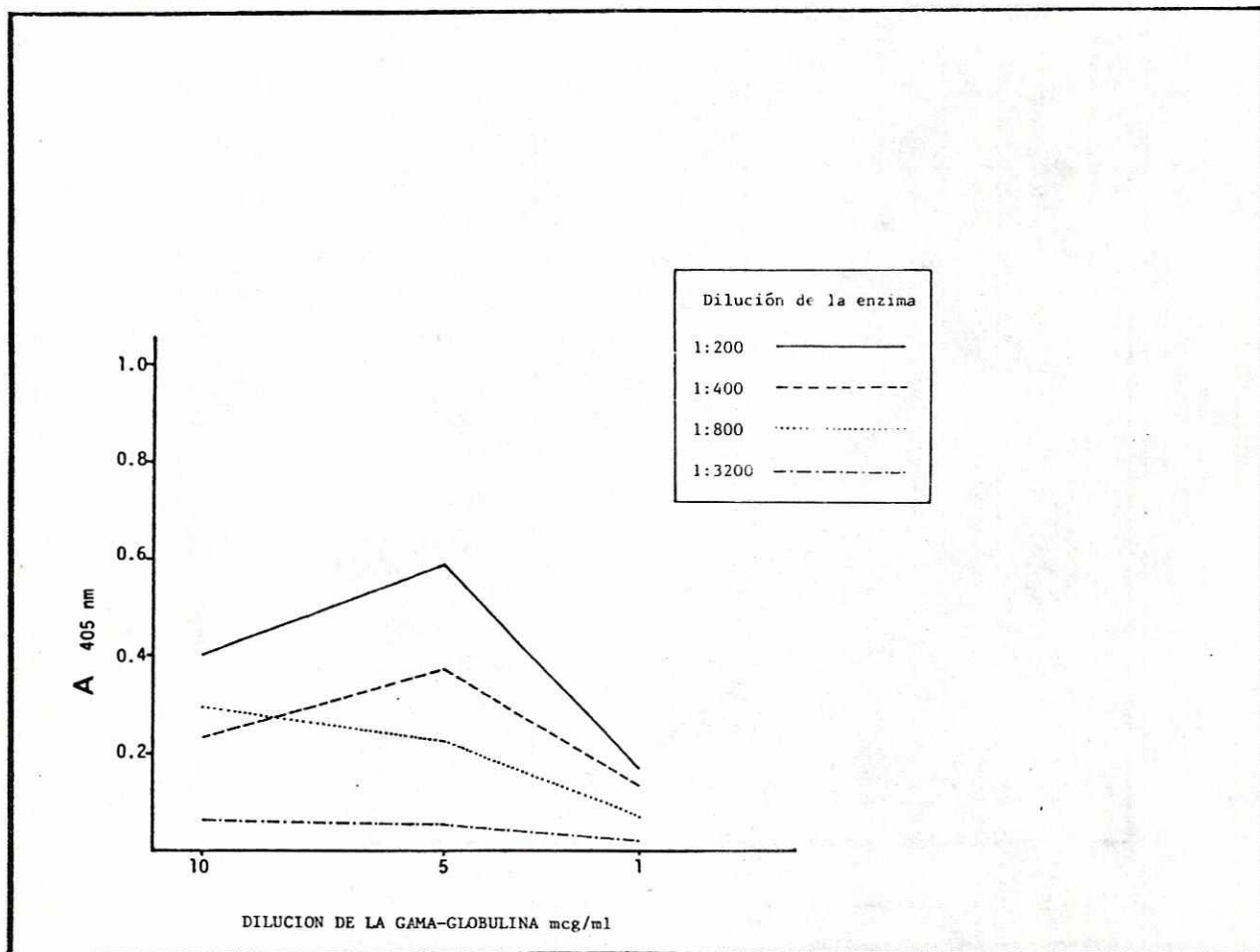


Fig. 4. Diagrama de las diluciones de la gama-globulina a diferentes diluciones de la enzima conjugada.

B. Dilución del antígeno

Con el fin de determinar la dilución más conveniente de extracto de planta enferma que se debe aplicar en la segunda etapa de ELISA, se evaluaron cuatro diluciones de extracto de planta enferma, 1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000. Para obtener las distintas diluciones se pesó un gramo de planta enferma y se maceró en diez mililitros de buffer de extracción obteniendo así una dilución de 1:10. De ella se hicieron las otras diluciones. Cada una de las diluciones se relacionaron con tres diluciones de gama-globulina, 10, 5 y 1 mcg/ml y con cuatro diluciones de la enzima conjugada 1:200, 1:400, 1:800 y 1:3,200. El diseño empleado es el que se muestra en la Fig.2. Se aplicó la técnica ELISA por triplicado, se hizo el análisis de varianza y se obtuvieron los resultados de las Figs. 5 y 6. (Véase apéndice cuadro 6).

Con los resultados obtenidos se puede ver que la mejor respuesta, tanto en relación con las distintas diluciones de la gama-globulina como de la enzima conjugada, es obtenida en una dilución de 1:100 del extracto de planta enferma. No obstante una dilución de 1:10 nos da respuestas positivas satisfactorias mientras que una dilución de 1:1,000 nos da respuestas positivas solo con diluciones altas de gama-globulina y de enzima conjugada. Para diluciones mayores de 1:1,000 no se dan respuestas positivas en la mayoría de los tratamientos o las respuestas son en general dudosas.

Para evaluar mejor el rango entre las diluciones 1:10 y 1:100 se hizo una nueva prueba que consistió en hacer diluciones de 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 y 1:100 del extracto de planta enferma. Se utilizó gama-globulina en concentración de 5 mcg/ml y una dilución de 1:400 de enzima conjugada. La Fig. 7 indica que la variación de respuesta entre las diluciones 1:10 y 1:100 es muy poca. (Véase cuadros 9, 10, 11 del apéndice).

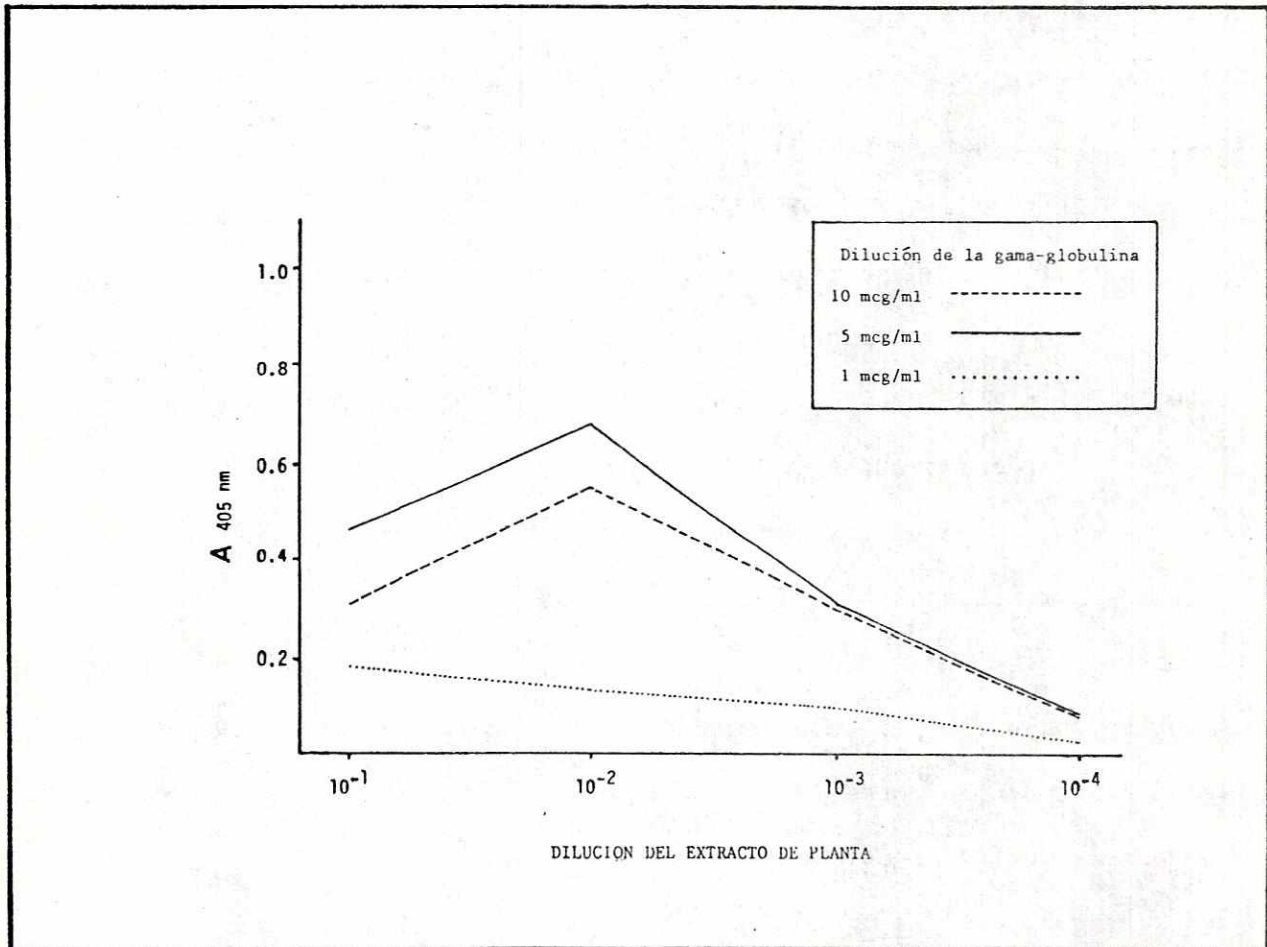


Fig. 5. Diagrama de las diluciones del extracto de planta enferma a diferentes concentraciones de gama-globulina.

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

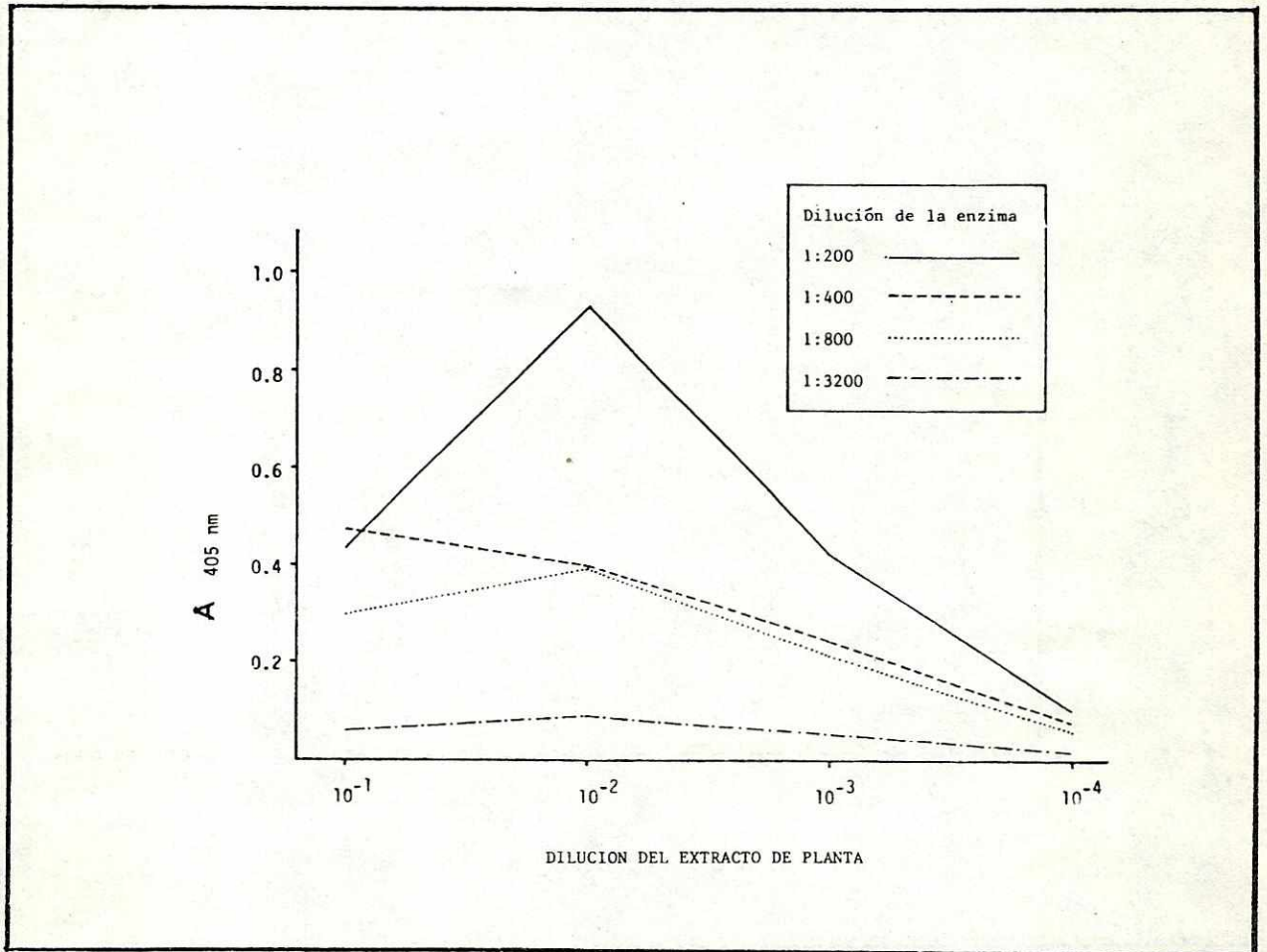


Fig. 6. Diagrama de las diluciones del extracto de planta enferma a diferentes concentraciones de la enzima conjugada.

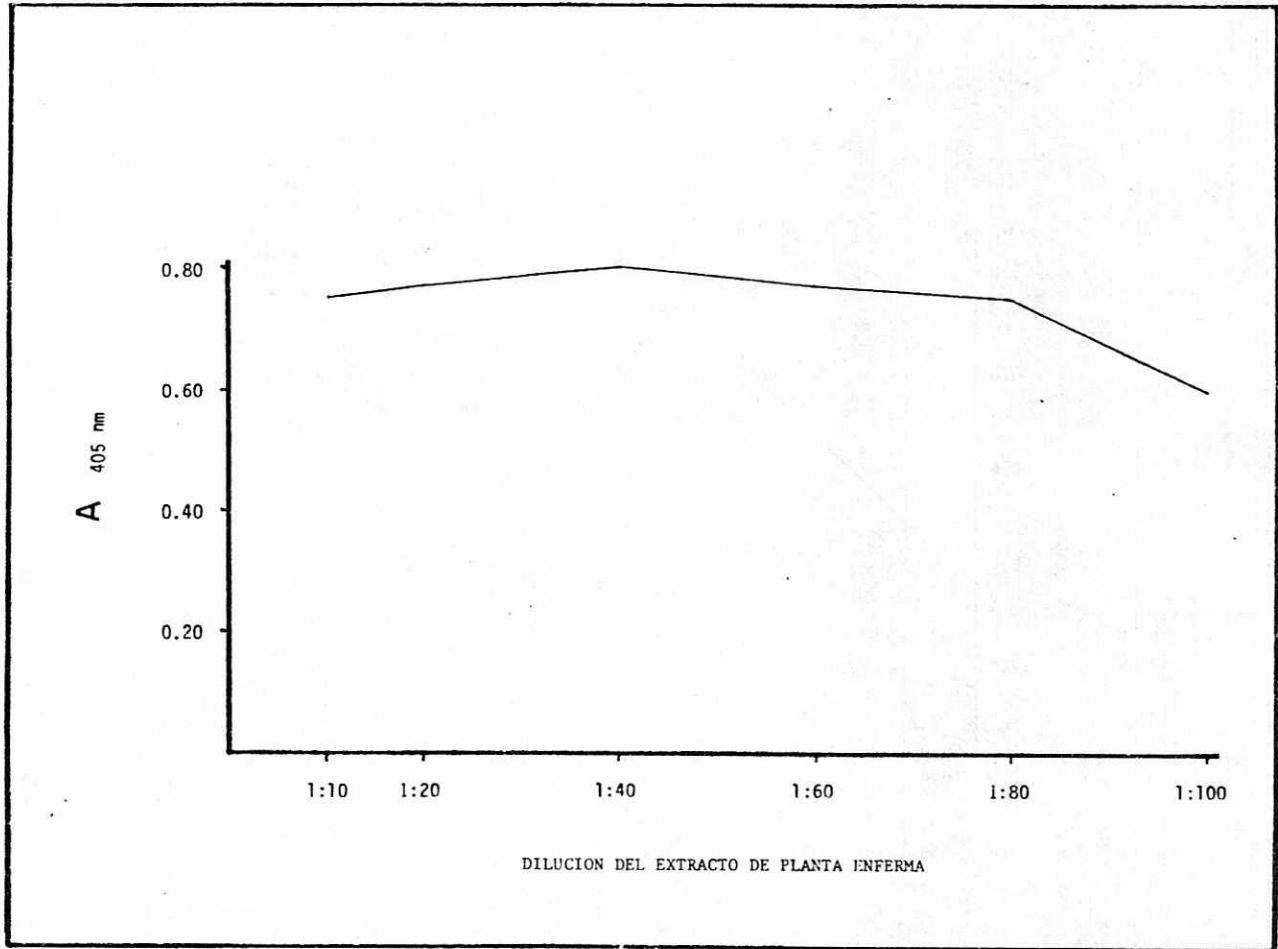


Fig. 7. Diagrama de las diluciones de extracto de planta enferma.

Dilución de la gama-globulina 5 mcg/ml

C. Dilución de la enzima conjugada

La finalidad del experimento es encontrar la dilución de enzima conjugada más apropiada para ser aplicada en la técnica ELISA. Se probaron cuatro diferentes diluciones 1:200, 1:400, 1:800 y 1:3,200 de enzima conjugada en buffer de enzima. Estas diluciones se confrontaron con tres diluciones de gama-globulina 10, 5 y 1 mcg/ml y cuatro diluciones del extracto de planta enferma, 1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000. El experimento se realizó en triplicado y con los datos obtenidos se hizo el análisis de varianza. En las Figs. 8 y 9 se muestran los resultados.

La respuesta óptima para todos los tratamientos ha sido obtenida con una dilución de enzima conjugada de 1:200. La dilución de 1:400 ha dado respuestas satisfactorias mientras que una dilución de 1:3,200 no da respuestas positivas. (Véase apéndice cuadro 7).

Al relacionar los tres factores estudiados, gama-globulina, extracto de planta enferma y enzima conjugada se puede ver (Fig. 2) que el mejor tratamiento lo tenemos en una relación de 5 mcg/ml de gama-globulina, 1:100 de extracto de planta enferma y una dilución de 1:200 de enzima conjugada. (Véase apéndice cuadro 4).

D. Especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo

Para probar que la gama-globulina usada en la técnica es específica para detectar la presencia del VMCar, se aplicó la técnica a macerados de plantas que anatómicamente presentaban síntomas clínicos de enfermedades virales. El ensayo demostró que únicamente los pocillos con muestras de plantas de cardamomo infectadas con VMCar presentaban reacción positiva. Esto demuestra que la reacción que se lleva a cabo con el antisuero gama-globulina anti-VMCar es específico para detectar la presencia de dicho virus.

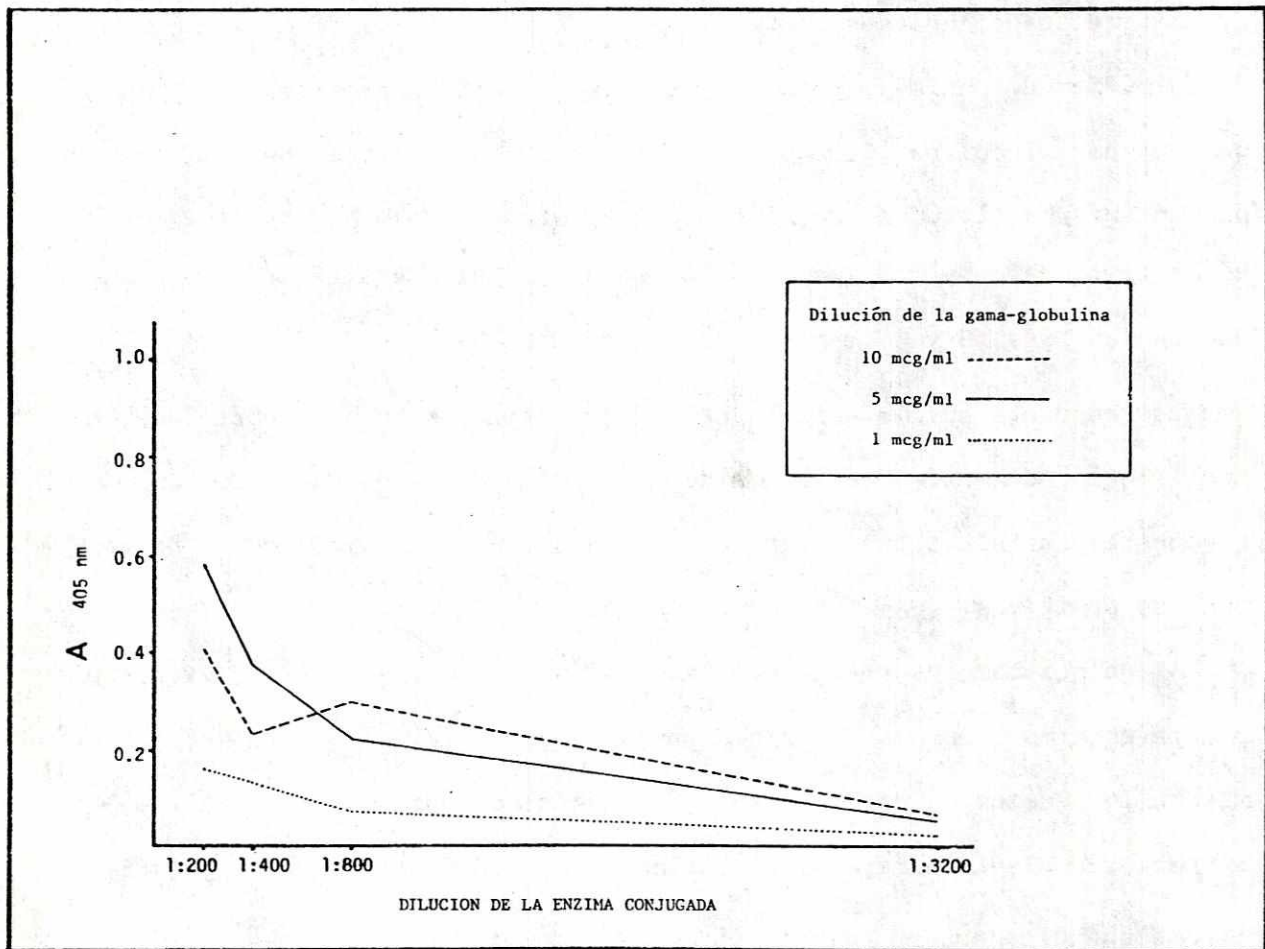


Fig. 8. Diagrama de las diluciones de enzima conjugada a diferentes concentraciones de gama-globulina.

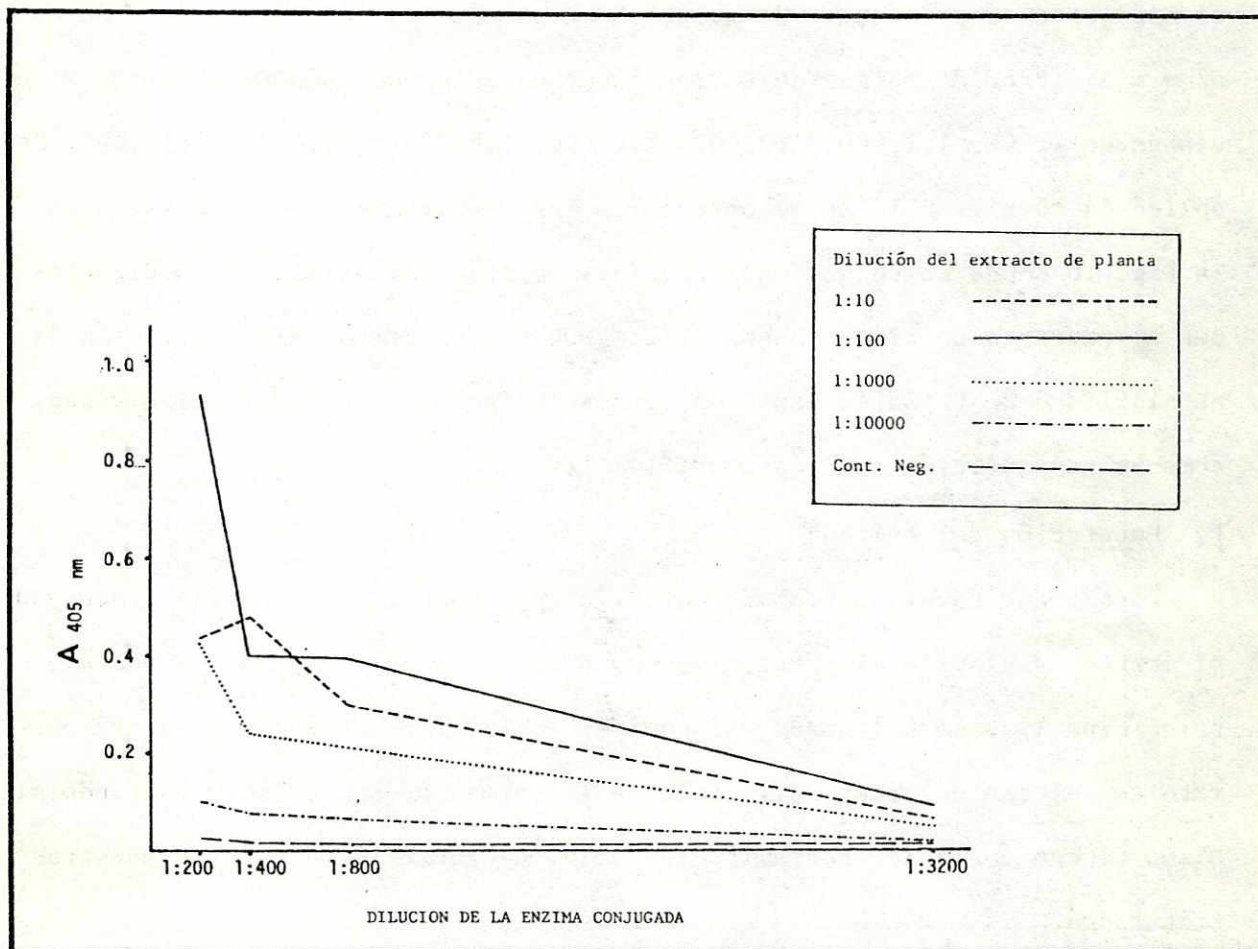


Fig. 9, Diagrama de las diluciones de la enzima conjugada a diferentes concentraciones del extracto de planta enferma.

E. Sensibilidad de la técnica

Para evaluar la sensibilidad de la técnica en la detección del VMCar, aún en plantas en las que la concentración del virus es baja, se realizó el siguiente experimento. Se maceró un gramo de hoja de planta enferma en diez mililitros de buffer de extracción y de este macerado se hicieron diluciones de 1:100, 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:6,000, 1:8,000 y 1:10,000. Se aplicó la técnica ELISA y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Fig. 10 donde se ve que esta técnica muestra sensibilidad para diluciones de extracto de planta hasta de 1:1,000 y a partir de dicha dilución la sensibilidad de ELISA es casi imperceptible tanto en una evaluación visual como en una medición con espectrofotómetro

F. Maceración del tejido

Para poder hacer un trabajo más eficiente y rápido que el realizado con el mortero y pistilo al macerar las muestras, se introdujo un aparato eléctrico tipo licuadora llamado "tissumizer". Se hizo una evaluación del aparato con el fin de poder utilizarlo de la forma más conveniente evitando al mismo tiempo cualquier contaminación de virus entre las distintas muestras trituradas.

Se maceraron plantas enfermas y sanas en una dilución de 1:25, realizando entre cada trituración uno o más lavados del aparato. El tiempo de los lavados fue de por lo menos diez segundos. El Cuadro 2 muestra el diseño empleado. Incluye ocho tratamientos diferentes para la planta y una serie de pasos en cada uno de los tratamientos. Para todos los procedimientos se utilizó la misma planta enferma y sana. Se aplicó la técnica ELISA a la muestra sana triturada al final de cada uno de los tratamientos del uno al seis, el ocho y a la enferma del tratamiento siete.

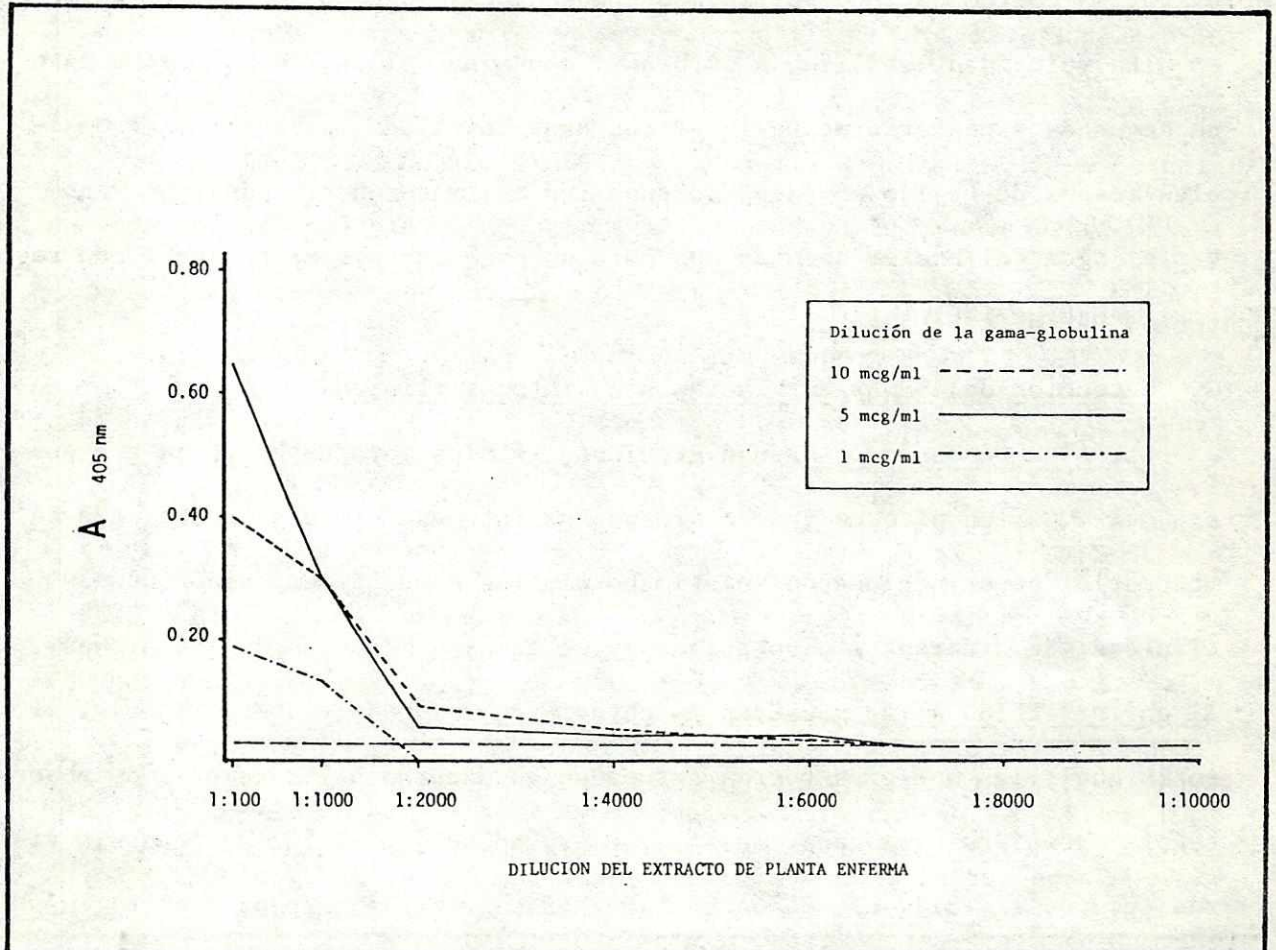


Fig. 10. Diagrama de las diferentes diluciones del extracto de planta enferma.

Dilución de la enzima conjugada usada 1:400

En el Cuadro 2 se observan los resultados que muestran que para cualquiera de los métodos de lavado empleados, no existió contaminación de virus entre las muestras a triturar, bastaría un simple lavado con agua para evitar la contaminación. El lavado puede hacerse accionando el "tissumizer" en alta velocidad, utilizando un beaker con agua del chorro de diez a catorce segundos y posteriormente lavar con agua destilada, para eliminar posibles restos de tejido en la parte superior del macerador. Conviene renovar el agua del beaker de modo que ésta no esté excesivamente sucia con restos de extracto de planta.

G. Detección del VMCar en plantas sin síntomas clínicos

ELISA ha demostrado ser una excelente técnica para detectar la presencia del VMCar en plantas que no presentan síntomas. En una prueba para demostrarlo, se seleccionaron veintiocho plantas de cardamomo sin síntomas clínicos, de diferentes plantaciones y se tomaron muestras de las mismas. Al aplicar ELISA a las muestras se obtuvieron los resultados de la Fig. 11, en la cual, las muestras fueron agrupadas de acuerdo a los valores de absorbanza obtenidos para cada muestra, observándose que el 52% aparece sin virus (grupos 1 y 2) y el 48% están infectadas de virus (grupos 3 al 8), dándose incluso un caso, el de la muestra ocho, con alta concentración del patógeno.

H. Determinación de la concentración de virus en la planta

La intensidad de reacción que se lleva a cabo en la última etapa de la técnica ELISA, reacción enzima-sustrato, está en relación a la cantidad de fosfatasa alcalina presente en los pocillos al aplicar el sustrato y por consiguiente a la cantidad de antígeno presente. La mayor o menor absorbanza medida en el espectrofotómetro, está en relación con la mayor o menor can

Cuadro 2. Diagrama de los pasos seguidos en el tratamiento de la muestra de planta

TRATAMIENTO	Tissumizer	Mortero	Planta enferma	Lavado con agua	Planta sana	Lavado con agua	Lavado con jabón	Limpiado con pinzas	Planta enferma	Lavado con agua	Planta enferma	Lavado con agua	Planta sana	EVALUACION VISUAL	Absorbancia 405 nm
	1	•		•	•		•							•	-
2	•		•			•				•			•	-	0.07
3	•		•	•	•	•			•	•			•	-	0.04
4	•		•	•					•	•	•	•	•	-	0.07
5	•		•			•	•			•			•	-	0.06
6	•		•				•			•			•	-	0.06
7		•	•											+	0.48
8		•											•	-	0.04

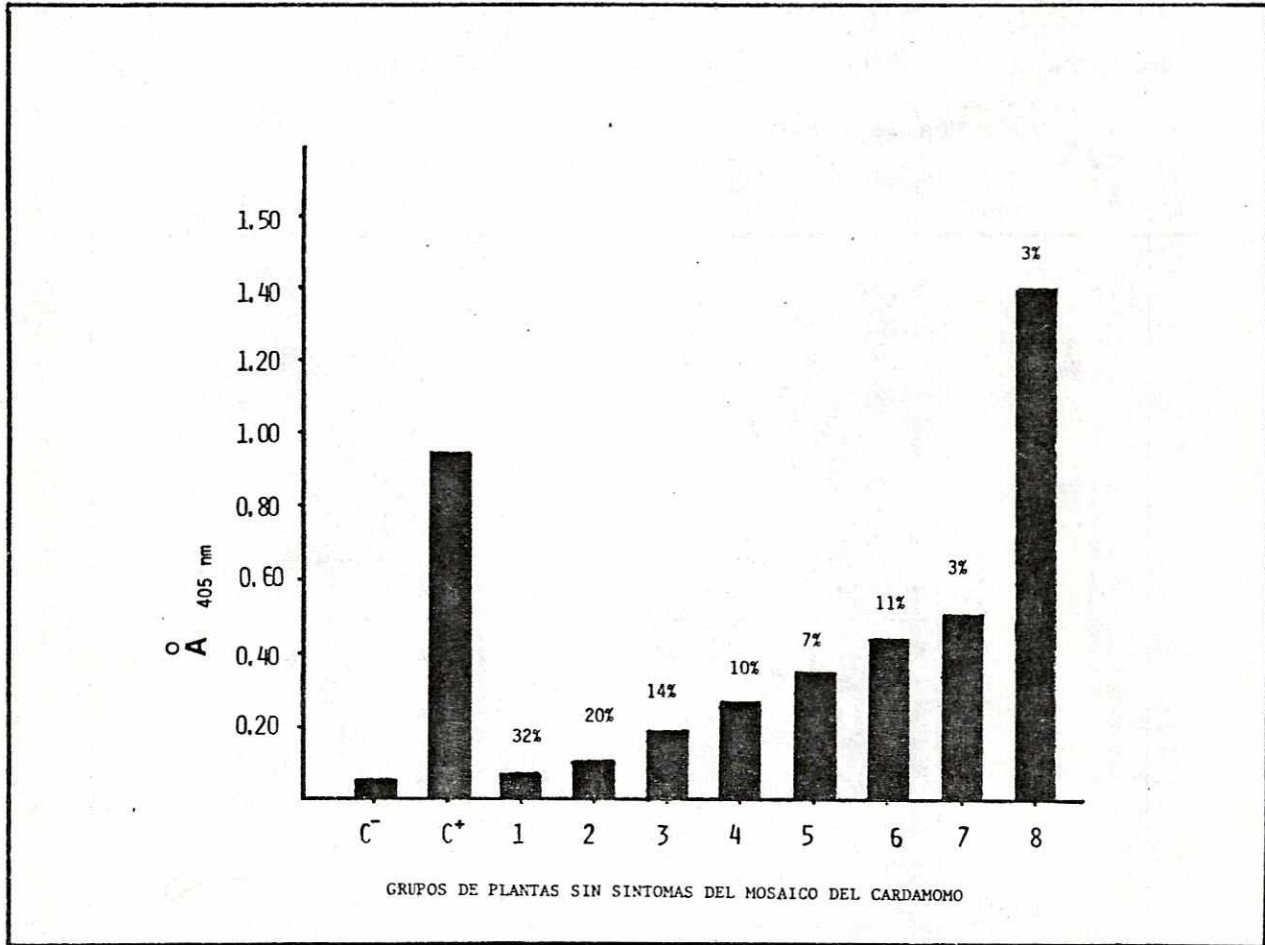


Fig. 11. Grupos de plantas sin síntomas clínicos de la enfermedad producida por el VMCar y porcentaje de plantas de cada grupo.

tividad de virus en la planta. En la prueba que se hizo al diluir el extracto de planta enferma y cuyos resultados se observan en la Fig. 10 muestran claramente la relación directa que existe entre la concentración de virus en la muestra y la absorbancia.

I. Diagnóstico por análisis con espectrofotómetro

Para poder determinar a partir de qué valor de absorbancia se debe considerar una muestra como sana o enferma, se siguió la sugerencia de Clark (10) de sumarle al valor medio obtenido de los controles negativos tres desviaciones estándar. El valor de la media de los valores de absorbancia de los controles negativos de la prueba es de 0.035 y el valor de la desviación estándar es 0.026 por lo que el valor aproximado de tres desviaciones estándar es 0.08. Según esto se puede tomar un valor de absorbancia de 0.11.

J. Purificación de la gama-globulina

La finalidad de la prueba es la de purificar la gama-globulina y determinar qué eluidos del fraccionamiento de la purificación deben guardarse para su aplicación en la técnica ELISA.

Cada una de las fracciones obtenidas en la purificación de la gama-globulina según el método anteriormente descrito, fue medida en el espectrofotómetro a 280 nm obteniéndose los resultados que se muestran en la Fig. 12. Se conservó el eluido de las fracciones del cuatro al diez en tubos de plástico a -18°C y se desechó el eluido de las demás fracciones que presentaban una absorbancia inferior a 1,00.

K. Conjugación de la gama-globulina

Para determinar la concentración ideal con la que trabaja mejor una determinada enzima conjugada con gama-globulina se sometió cada una de las en

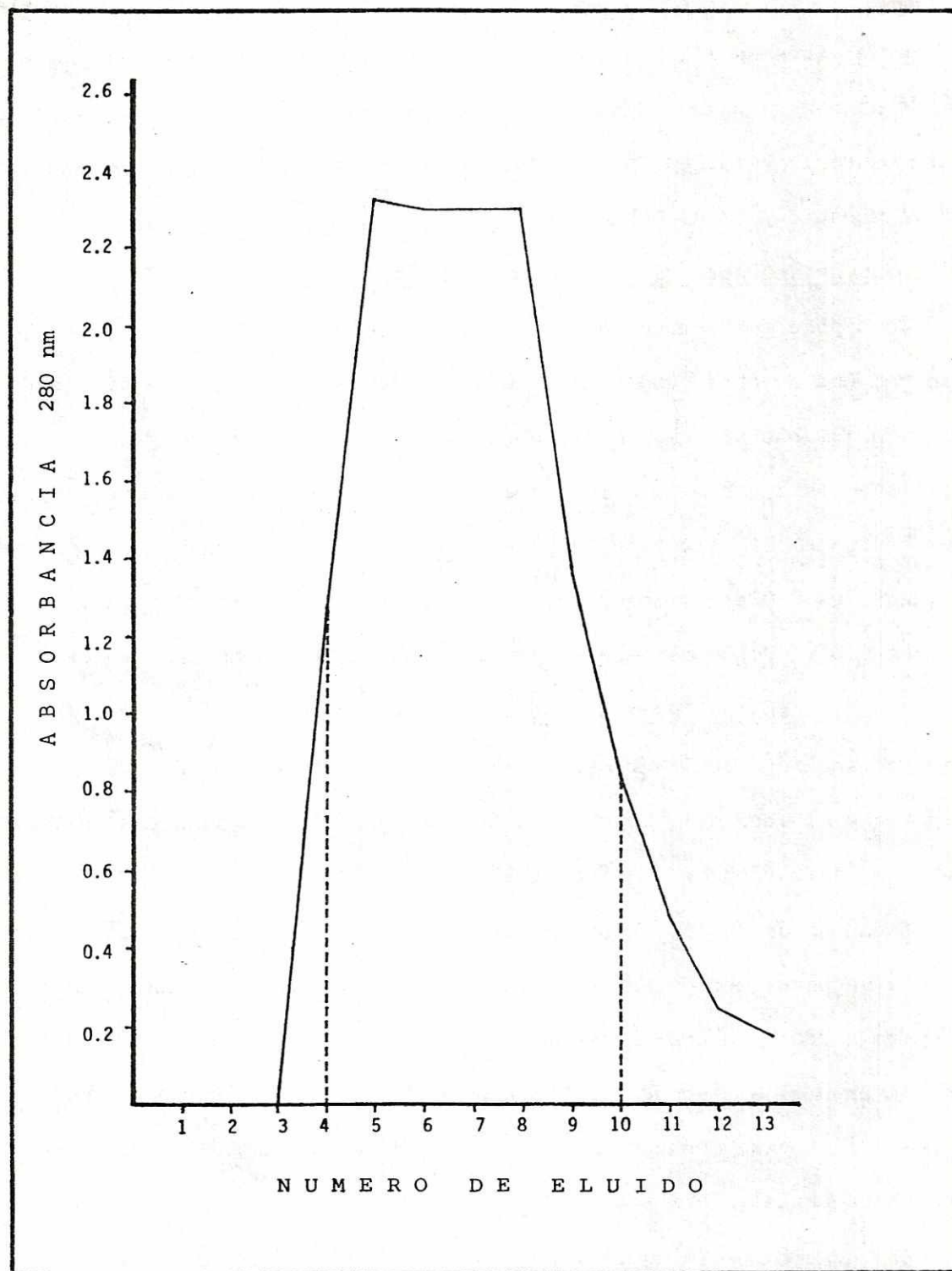


Fig. 12. Resultados de la purificación de la gama-globulina

zimas conjugadas a una prueba según el diseño de la Fig. 2. Las tres enzimas conjugadas en distintos momentos mostraron un comportamiento muy parecido en líneas generales. Se puede ver (Fig. 2) que los mejores resultados se obtuvieron con diluciones de 1:200 y 1:400, mientras que para diluciones mayores de 1:800 no se da respuesta positiva clara.

V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Basados en los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que ELISA es una excelente técnica para la detección del VMCar. Su sensibilidad se ha puesto de manifiesto al detectar la presencia del virus en diluciones de extracto de planta enferma hasta de 1:1,000, lo cual indica que puede detectar la presencia del patógeno en plantas en las que su concentración es muy pequeña. Ha demostrado también la especificidad del suero anti-VMCar para detectar dicho virus.

En los ensayos realizados para determinar las diluciones ideales del antisuero gama-globulina, del extracto de planta enferma y de la enzima conjugada, se ha llegado a la conclusión de que la gama-globulina trabaja mejor en todos los tratamientos a una concentración de 5 mcg/ml. Esto confirma que tanto concentraciones mayores como menores a la ideal son capaces de bloquear la reacción.

Con relación a la dilución del extracto de planta enferma, se ha encontrado que la dilución ideal es 1:100. En la prueba para analizar el rango de dilución del extracto de planta enferma entre 1:10 y 1:100 se ha encontrado que no existe una diferencia significativa entre los distintos tratamientos. Se ha decidido para facilidad de trabajo, una dilución de 1:25 con lo que se facilita el trabajo de triturado y de pipeteo.

Respecto a la dilución de la enzima conjugada, la dilución 1:200 ha demostrado ser más eficiente en la mayoría de los tratamientos, no obstante que la dilución 1:400 ha dado muy buenos resultados. Hemos decidido tomar esta dilución 1:400 por resultar eficiente y al mismo tiempo más económica que 1:200.

Otra de las grandes ventajas que presenta ELISA es la de poder detectar la presencia del VMCar en plantas que no presentan síntomas, esta característica es de suma importancia a la hora de decidir sobre si sembrar o no un determinado material, o si llevar o no al campo definitivo las plantas de un semillero, así como para evaluar susceptibilidad varietal. Las experiencias realizadas indican que existe un alto porcentaje de plantas de cardamomo aparentemente sanas pero que están infectadas por el VMCar y en algunos casos con altas concentraciones del mismo.

La capacidad para cuantificar la concentración del virus es importante si se tiene en cuenta que determinadas plantas podrían convivir con el virus en bajas o altas concentraciones. La técnica permite también detectar qué parte de la planta está infectada y cómo se comporta una determinada variedad o línea en los distintos medios ecológicos.

En relación al diagnóstico por análisis con espectrofotómetro, fue necesario determinar el valor de absorbancia al que se debe considerar si una muestra tiene o no virus. La decisión de ajustarse a la idea de Clarck (10) ha parecido la más acertada dada la carencia de medios para poder tomar otra decisión mejor. Se puede tomar la siguiente alternativa, o decidir que una lectura sobre 0.11 de absorbancia debe tomarse como reacción positiva y por debajo como negativa, o bien tomar la media de los controles negativos en cada caso y sumar la de 0.08 que corresponde a tres desviaciones estándar de la media de los controles negativos de los experimentos realizados. El valor de absorbancia de 0.11 parece bastante acertado si tenemos en cuenta que en los experimentos realizados en los tratamientos cuya lectura de absorbancia ha sido de 0.15 aparece ya una coloración bastante definida.

No obstante lo más recomendable es que para cada ELISA corrido se saque la media y desviación estándar de los controles negativos y se sume a la media tres desviaciones estándar para determinar el valor de absorbancia a partir del cual una muestra debe considerarse con o sin VMCar.

Un nuevo método, que podría dar muy buenos resultados, podría emplearse para tomar una decisión con las muestras analizadas. (Véase apéndice pág. 52).

Dado que las condiciones en que se realiza ELISA son variables, tanto en temperaturas, lavados, rapidez de reacción enzima-sustrato, como en el tiempo de duración de la reacción hasta que ésta se detiene, la coloración que aparece también es variable, de ahí que sea necesario restar al valor de la absorbancia obtenida de cada tratamiento, el valor de absorbancia del buffer en el caso en el que el espectrofotómetro se haya estandarizado con agua destilada.

Es importante señalar que en el momento de decidir en los casos dudosos, será preferible rechazar como enferma una planta sana, que aceptar como sana una que realmente esté enferma. Es más fácil verificar más tarde con la planta que se rechazó, que correr el riesgo de aceptar como sano un material enfermo que puede contaminar y diseminar el virus en la plantación.

VI. APENDICE

Cuadro 3. Valores de absorbancia de los tratamientos para la estandarización de la técnica ELISA para la detección del VMCar.

C⁻ representa el control negativo, extracto de planta sin VMCar.

Dilución de gama-globulina mcg/ml	Dilución del extracto de planta	Dilución de enzima-conjugada	Repeticiones			Suma
			I	II	III	
10	10 ⁻¹	1:200	0.43	0.32	0.23	0.98
		1:400	0.38	0.34	0.28	1.00
		1:800	0.46	0.55	0.43	1.35
		1:3200	0.13	0.08	0.10	0.31
	10 ⁻²	1:200	1.25	1.00	0.95	3.20
		1:400	0.48	0.40	0.33	1.21
		1:800	0.80	0.48	0.58	1.86
		1:3200	0.14	0.16	0.09	0.39
	10 ⁻³	1:200	0.58	0.41	0.47	1.46
		1:400	0.40	0.29	0.20	0.89
		1:800	0.38	0.27	0.30	0.95
		1:3200	0.07	0.11	0.06	0.24
	10 ⁻⁴	1:200	0.17	0.13	0.10	0.40
		1:400	0.11	0.13	0.09	0.33
		1:800	0.10	0.07	0.05	0.22
		1:3200	0.02	0.04	0.00	0.06
C ⁻	1:200	0.00	0.07	0.03	0.10	
	1:400	0.03	0.02	0.00	0.05	
	1:800	0.01	0.03	0.00	0.04	
	1:3200	0.00	0.00	0.02	0.02	0.21
5	10 ⁻¹	1:200	0.80	0.65	0.55	2.00
		1:400	0.92	0.81	0.70	2.43
		1:800	0.40	0.30	0.27	0.97
		1:3200	0.06	0.08	0.05	0.19
	10 ⁻²	1:200	1.81	1.50	1.13	4.44
		1:400	0.70	0.68	0.53	1.91
		1:800	0.46	0.55	0.40	1.41
		1:3200	0.15	0.12	0.08	0.35
	10 ⁻³	1:200	0.71	0.57	0.51	1.79
		1:400	0.34	0.30	0.26	0.90
		1:800	0.26	0.30	0.20	0.76
		1:3200	0.04	0.09	0.07	0.20
	10 ⁻⁴	1:200	0.20	0.17	0.14	0.51
		1:400	0.09	0.11	0.06	0.26
		1:800	0.10	0.09	0.05	0.24
		1:3200	0.00	0.03	0.02	0.05
C ⁻	1:200	0.05	0.02	0.01	0.08	
	1:400	0.04	0.00	0.01	0.05	
	1:800	0.00	0.01	0.00	0.01	
	1:3200	0.03	0.00	0.00	0.03	0.17
1	10 ⁻¹	1:200	0.36	0.32	0.26	0.94
		1:400	0.30	0.34	0.22	0.86
		1:800	0.14	0.13	0.09	0.36
		1:3200	0.05	0.00	0.00	0.05
	10 ⁻²	1:200	0.26	0.28	0.20	0.74
		1:400	0.23	0.18	0.15	0.56
		1:800	0.12	0.07	0.09	0.28
		1:3200	0.05	0.00	0.02	0.07
	10 ⁻³	1:200	0.24	0.20	0.17	0.61
		1:400	0.16	0.13	0.10	0.39
		1:800	0.10	0.05	0.06	0.21
		1:3200	0.01	0.05	0.00	0.06
	10 ⁻⁴	1:200	0.04	0.02	0.00	0.06
		1:400	0.07	0.02	0.05	0.14
		1:800	0.06	0.05	0.02	0.13
		1:3200	0.05	0.01	0.02	0.08
C ⁻	1:200	0.07	0.00	0.00	0.07	
	1:400	0.00	0.00	0.02	0.02	
	1:800	0.00	0.07	0.00	0.07	
	1:3200	0.05	0.00	0.00	0.05	0.21
Suma por repeticiones			15.46	13.20	10.73	39.39

Cuadro 4. Análisis de varianza

Fuentes de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.T.	F.T.	
					0.05	0.01
Tratamientos	59	14.134	0.240	46.69**	1.43	1.66
Gama-globulina	2	1.471	0.735	143.33**	3.07	4.79
Extracto de planta	4	4.691	1.173	228.60**	2.45	3.48
Enzima conjugada	3	2.625	0.875	170.54**	2.68	3.95
Gama X Extracto	8	1.244	0.156	30.32**	2.02	2.66
Gama X Enzima	6	0.771	0.128	25.04**	2.17	2.96
Extracto X Enzima	12	2.282	0.190	37.06**	1.83	2.34
Gama X Extracto X Enzima	24	1.050	0.044	8.52**	1.66	2.03
Error	120	0.616	0.005			
Total	179	14.750	0.082			
C.V. 32.14						

** diferencia significativa al 0.01

Cuadro 5. Prueba de Duncan para los niveles de Gama-globulina

Promedios	2	3	4	5
t_{01} (120)	3.64	3.80	3.90	3.98
\bar{Sx}	0.009	0.009	0.009	0.009
L.S.	0.033	0.034	0.035	0.036
Diluciones de Gama-globulina		5 mcg/ml	10 mcg/ml	1 mcg/ml
\bar{x}		0.310	0.251	0.096

Cuadro 6. Prueba de Duncan para los niveles de extracto de planta

Promedios	2	3	4	5
t_{01} (120)	3.64	3.80	3.90	3.98
\bar{Sx}	0.012	0.012	0.012	0.012
L.S.	0.044	0.046	0.047	0.048
Dilución de extracto de planta	10^{-2}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-4} C ⁻
\bar{x}	0.456	0.317	0.235	0.069 0.016

Cuadro 7. Prueba de Duncan para los niveles de dilución de enzima conjugada.

Promedios	2	3	4	
$t_{01}(120)$	3.64	3.80	3.90	
$S\bar{x}$	0.011	0.011	0.011	
L.S.	0.040	0.042	0.043	
Dilución de enzima conjugada	1:200	1:400	1:800	1:3200
\bar{x}	0.386	0.244	0.197	0.048

Cuadro 8. Prueba de Duncan para los tratamientos

Promedios	2	3	4	5	6	
$t_{01}(120)$	3.64	3.80	3.90	3.98	4.04	
$S\bar{x}$	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	
L.S.	0.149	0.156	0.160	0.163	0.166	
Diluciones						
Gama-glob.	5	10	5	5	5	10
Extracto	1:100	1:100	1:10	1:10	1:100	1:100
Enzima conj.	1:200	1:200	1:400	1: 200	1:400	1:800
\bar{x}^*	1.48	1.10	0.81	0.67	0.64	0.62

* Solo se han puesto en el cuadro para la comparación, las medias de los tratamientos cuyos valores de absorbancia son más elevados. Véase Fig. 2 el resto de las medias comparadas.

Conclusiones:

El análisis de varianza de los datos del experimento (Cuadro 4) muestra que se dan diferencias altamente significativas entre las distintas diluciones de gama-globulina, extracto de planta y enzima conjugada. y entre las distintas interacciones de primer y segundo orden de las mismas. Se halló así mismo diferencia altamente significativa para los tratamientos. Un C.V. de 32.14 hace a los datos confiables.

Al realizar la prueba para comparación de medias se encontró que se da diferencia altamente significativa entre las distintas diluciones de gama-globulina (Cuadro 5) , de extracto de planta (Cuadro 6) , y de enzima conjugada (Cuadro 7) , resultando más eficiente la de 5 mcg/ml para gama-globulina, 1:100 para extracto de planta enferma y 1:200 para la enzima conjugada.

Por lo que respecta a los tratamientos, se puede ver (Cuadro 8) que el mejor tratamiento es el de 5 mcg/ml de gama-globulina frente a 1:100 de extracto de planta enferma y 1:200 de enzima conjugada.

Cuadro 9. Valores de absorbancia de los tratamientos para encontrar la dilución ideal de extracto de planta enferma. Los valores de absorbancia fueron medidos a 405 nm.

Dilución del extracto de planta. Partes en	Repeticiones			Suma
	1	2	3	
1:10	0.71	0.68	0.77	2.16
1:20	0.72	0.79	0.76	2.27
1:40	0.73	0.78	0.92	2.43
1:60	0.70	0.77	0.84	2.31
1:80	0.67	0.78	0.80	2.25
1:100	0.65	0.60	0.64	1.89
C ⁻	0.04	0.06	0.03	0.13
Suma total				13.44

Cuadro 10, Análisis de varianza

Fuentes de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.T.	
					05	01
Tratamientos	2	1.30	0.650	2.16**	3.55	6.01
Error	18	0.05	0.003			
Total	20	1.35				
C.V 8.56						

** diferencia significativa al 0.01

Cuadro 11. Prueba de Duncan para los tratamientos

Promedios	2	3	4	5	6	7	
$t_{01} (10)$	4.07	4.27	4.38	4.46	4.53	4.59	
\bar{Sx}	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	
L.S.	0.13	0.14	0.14	0.14	0.15	0.15	
Tratamientos	1:40	1:60	1:20	1:80	1:10	1:100	C ⁻
\bar{x}	<u>0.81</u>	<u>0.77</u>	<u>0.75</u>	<u>0.75</u>	<u>0.72</u>	0.63	0.04

Conclusiones:

Se da diferencia altamente significativa entre los tratamientos. Al aplicar la prueba de Duncan a las medias de los tratamientos se ve que existe diferencia altamente significativa entre la media del control y la del resto de los tratamientos pero no existe diferencia significativa entre los tratamientos en los que se utilizaron diluciones de extracto de planta enferma desde 1:10 hasta 1:80 por lo que se podría utilizar cualquiera de estas diluciones para ELISA. El 8.56 del C.V. de la prueba indica una buena fiabilidad en los resultados.

Cuadro 12. Valores de absorbancia a 405 nm de los tratamientos de ELISA para el análisis por espectrofotómetro.

Dilución del extracto de planta	Muestra	repeticiones				\bar{x}
10^{-1}	A	0.90	0.83	0.85	0.91	0.87
	B	0.58	0.60	0.55	0.64	0.59
10^{-2}	A	0.67	0.61	0.70	0.60	0.65
	B	0.50	0.54	0.46	0.57	0.52
10^{-3}	A	0.34	0.37	0.30	0.35	0.34
	B	0.21	0.22	0.27	0.25	0.34
10^{-4}	A	0.07	0.05	0.03	0.06	0.05
	B	0.03	0.05	0.04	0.02	0.04
10^{-5}	A	0.01	0.04	0.03	0.07	0.04
	B	0.01	0.03	0.02	0.05	0.03
C^-		0.00	0.07	0.05	0.00	
		0.04	0.01	0.06	0.05	0.035

Diagnóstico por análisis con espectrofotómetro

A parte de lo señalado anteriormente para el análisis de las muestras con espectrofotómetro, un nuevo método podría ser empleado para determinar si una muestra analizada está o no infectada por el VMCar.

Skoog y West (38) proponen una ecuación para determinar si dos materiales son diferentes o idénticos en base a una serie de análisis cuantitativos de las dos muestras. Esta ecuación puede ser utilizada para determinar en base a la absorbancia, si existe o no diferencia entre la muestra de la planta a analizar y la muestra de una planta libre del VMCar que sirve como blanco o control negativo.

Con el fin de establecer la existencia o ausencia de una diferencia real, entre la media de los valores de absorbancia de la muestra a analizar y la media de los valores de absorbancia de los blancos o controles negativos, aplicamos la siguiente ecuación:

$$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = t \cdot ts \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 \cdot N_2}}$$

El valor numérico para el término de la derecha se calcula tomando de las tablas el valor de t para el nivel de confianza deseado, que podría ser 95% para la generalidad de los casos y del 99% si se deseara extrema fiabilidad de los resultados.

X_1 media de los valores de absorbancia de la muestra a analizar

X_2 media de los valores de absorbancia de los blancos o controles negativos

N_1 número de valores de absorbancia de la muestra a analizar

N_2 número de valores de absorbancia de los blancos o controles negativos

s desviación estándar de los valores de absorbancia de la muestra y de los controles negativos

Los grados de libertad para encontrar el valor de t en las tablas será

$$N_1 + N_2 - 2 .$$

Si la diferencia experimental $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$, es menor que el valor calculado, ninguna diferencia significativa entre las muestras puede ser asumida y en consecuencia la muestra analizada estaría ausente de VMCar. Por otro lado, una diferencia experimental $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$ mayor que el valor calculado en base a t, indica la existencia de diferencia significativa entre las muestras y en consecuencia el VMCar estaría presente en la muestra analizada.

Es conveniente al correr ELISA hacer más de dos repeticiones para cada muestra y para el control negativo con el fin de tener el mayor número de valores posibles de absorbancia para comparar de manera que los resultados sean más confiables. Los valores de los controles negativos pueden servir para la comparación con los distintos valores de absorbancia de cada muestra analizada.

El valor calculado de la segunda parte de la ecuación sirve de nivel de confianza de la comparación.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, A.N. The detection of plum pox virus in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. Appl. Biol.* 90:215-21. 1978.
2. AMEZQUITA, M.O. Técnicas de producción utilizadas en el cultivo del cardamomo (*Elettaria cardamomum*), según tamaño de explotación agrícola en Alta Verapaz. Tesis Ong. Agr., Guatemala, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1978. 57 pp.
3. AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6:43-52. 1969.
4. BARBARA, D.J., M.F. Clark, and J.M. Tresh. The distribution of necrotic ringspot virus serotypes. *Proc. Ann. Biol.* 90:395-399. 1980.
5. BARBARA, D.J. et al. Rapid detection and serotyping of prunus necrotic ringspot virus in perennial crops by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Appl. Biol.* 90:395-99. 1978.
6. BAR-JOSEPH, M. et al. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69:190-94. 1979.
7. CAMARA DEL AGRO. Oct., Vol. I, No. 7, Guatemala, C.A., pp.6-12. 1979.
8. CASPER, R., Detection of potato leafroll virus in potato and in *Phytalis floridana* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathol. Z.* 90:364-68. 1977.
9. CLAFLIN, L.E., and J.K. Uyemoto. Serodiagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathol. News.* 12:156 (Abstr.). 1978.
10. CLARCK, M.F., Immunosorbent assay in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19:83-106. 1981.
11. CLARK, M.F., and A.N. Adams. Characteristics of the Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of planta viruses. *J.Gen. Virol.* 34:475-83. 1977.
12. CLARK, M.F. et al. The detection of *Spiroplasma citri* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathol. Z.* 92:332-37. 1978.
13. CLARK, R.G., R. Converse, M. Kojima. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect potato leafroll virus in potato tubers and virouliferous aphids. *Plant Dis.* 64:43-45. 1980.

14. CONVERSE, R.H. Detection of tomato ringspot virus in red raspberry by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant. Dis. Rep.* 62:189-192. 1978
15. DERRICK, K.S. Quantitative assay for plants viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* 56:652-53. 1973.
16. DETIENE, G., R. Delbos, and J. Denez. Use and Versatility of the immunoenzymatic ELISA procedure in the detection of different strains of apple chlorotic leafspot virus. 11th Int. Symp. Fruit Tree Diseases, Budapest. In press. 1979.
17. ENGWAL, E., and P. Perlmann. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *immunochemistry* 8:871-74. 1971.
18. ENRIQUEZ, V.H. El cultivo del cardamomo (*Anomum cardamomum*), 2a. edición, Guatemala, Ministerio de Agricultura, Sección de Información y Educación Agrícola, 1968. 5pp
19. FLEGG, C.L., and M.F. Clark. The detection of apple chlorotic leafspot virus by modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. Appl. Biol.* 91:61-65, 1979.
20. FLORES, E. Cultivo del cardamomo. Ministerio de Agricultura. Guatemala, C.A. , 1979. 11 pp.
21. FRENCH, E.R., and T.T. Hebert. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José Costa Rica, 1980. 289 pp.
22. Gera, A., G.L. Lobenstein, and B. Raccah. Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay. *Virology* 86:542-545, 1978.
23. GIBBS, A., And B. Harrison. *Plant Virology The principles.* Edward Arnold, London, 1976. 792 pp.
24. GONZALEZ, E. Cultivo del cardamomo. Ministerio de Agricultura, Guatemala, C.A. 1977. 16 pp.
25. GUATEMALA. BANCO DE GUATEMALA. Informe Económico. Abril-septiembre. Guatemala 1979. 68 pp.
26. GUGERLI, P. Potato virus ando potato leafroll virus: Purification. antiserum production and serological detection in potato and test plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) *Phytopathol. Z.* 96:97-107. 1979.

27. HIBINO H. and I. Kimura. Detection of Rice Ragged Stunt virus in Insect vectors by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathology* 72:656-659. 1982
28. KISHINEVSKY, B. and M. Bar-Joseph. Rhizobium strain identification in *Arachis Hypogaea* nodules by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) *Can. J., Microbiol.* 24:1537-43. 1978.
29. LISTER, R.M. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting virus in soybean seed and plants. *Phytopathology* 68:1393-1400. 1978.
30. LISTER, R.M. and W.F. Rochon. Detection of barley yellow dwarf by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 69:649-54. 1979.
31. MARCO, S., and S. Cohen. Rapid detection and titer evaluation of viruses in pepper by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathology* 69:1259-62. 1979.
32. MCLAUGHLIN, M.R., and U.W. Barnett. The influence of plant sap and antigen buffer additives and the enzyme-immunoassay of two plant viruses. *Phytopathology* 69:1083(Abstr.). 1979.
33. PARRY, J.W. *Species*. Vol. II. Chemical Publishing Co., Inc. New York, 1969. 235 pp.
34. REEVERST, J.T. et al. Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of two maize viruses. *Plant Dis.* 62:667-671. 1978.
35. SHANMUGANATHAN, N., and G. Flecher. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect fanleaf virus in grapevines grown in containers. *Plant Dis.* 66:704-707. 1982.
36. SIMHON, A. et al. Diagnóstico del rotavirus por microscopía electrónica y ensayo inmunosorbente enzima-conjugada (ELISA). Enviado a *Bol. Of. Sanit. Panam.* 86 (5). 1978.
37. SIMHON, A. et al. El ensayo inmunosorbente enzima-conjugada (ELISA) en el diagnóstico del rotavirus. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños* 12 (2):73-78. 1977.
38. SKOOG, D.A., and D.M. West. *Fundamentals of analytical chemistry*. 2a edición. Holt, Rinehart and Winston. New York, 1969. pp 66-69.
39. THEREXH, J.M. et al. The detection of three viruses of hop (*Humulus lupulus*) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) *Ann. Appl. Biol.* 87:57-65. 1977.

40. UPAL, B.N., P.M. Verma, and S.P. Capoor. A Mosaic disease of Cardamom *Curv. Sci.*, XIV, 8, 1945. pp 208-209.
41. VOLLER, A. et al. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) *J. Gen. Virol.* 33:165-167. 1976.