

## HISTORIAS DE LA INMUNOLOGÍA/ SEROLOGÍA EN ESPAÑA CONTADAS POR UN FITOPATÓLOGO

MARIANO CAMBRA ÁLVAREZ

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).  
(jubilado)  
Moncada (Valencia)

### INTRODUCCIÓN

Érase una vez una Patología Vegetal que hasta la década de 1970 basaba los métodos de detección, diagnóstico y caracterización de agentes patógenos en observación de síntomas, inoculación mecánica de plantas indicadoras herbáceas o injerto de plantas indicadoras leñosas, transmisión por cuscuta o por vectores, aislamiento en medios de cultivo, microscopía óptica y electrónica, pruebas bioquímicas y fisiológicas, y en algunas pruebas inmunológicas o serológicas. Entre estas últimas, las más utilizadas eran: métodos de aglutinación simple o al látex o bentonita en tubo o portaobjetos, precipitación y difusión doble de Ouchterlony [Figura 1] y radial o de Mancini en medio con agar [Figura 2], inmunoelectroforesis e inmunofluorescencia indirecta.



**Figura 1.** Equipo de inmunodifusión: mesa de nivel para el medio con agar en soportes de plástico para portaobjetos de cristal, tanques incubadores y troquel. En la parte inferior izquierda de la vetusta diapositiva, varios ejemplos ya desecados y teñidos de comparación de antígenos por inmunodifusión doble o de Ouchterlony (el antisuero diluido en el pocito central; y, alrededor, distintos antígenos para ser comparados) y titulación de antisueros en diluciones seriadas de los mismos.

En este relato, que no cuento histórico novelado o de ficción, me referiré a métodos inmunológicos (también conocidos comúnmente por serológicos), frecuentemente desarrollados en Europa, es decir, a aquellos métodos que están relacionados con la inmunización de animales para producir antisueros (anticuerpos policlonales), anticuerpos monoclonales específicos mediante la tecnología de hibridomas, y anticuerpos recombinantes. Pero también, especialmente el término 'serología', se refiere al uso de los anticuerpos producidos para detectar e identificar comparativamente antígenos (patógenos de plantas o sus metabolitos), y realizar estudios epidemiológicos para mejorar el control, pues a todo ello han contribuido significativamente, en especial desde 1976 hasta la actualidad, la inmunología y la serología aplicadas a la Fitopatología. En unas líneas veremos la razón de esa



**Figura 2.** Inmunodifusión radial o de Mancini. Se observa un halo de precipitado alrededor de las muestras (extracto bruto o discos de hoja) infectadas, colocadas dentro del gel que contiene anticuerpos específicos del patógeno a detectar. Constituyó un intento de detección rutinaria de virus y bacterias en la época.

fecha concreta, tan lejana para muchos y tan próxima para otros con más experiencia.

El objetivo de los virólogos y bacteriólogos involucrados en inmunología básicamente ha sido la generación de anticuerpos y su uso mediante técnicas serológicas. Actualmente, la inmunología para los fitopatólogos incluye la producción, purificación y expresión de antígenos, producción de anticuerpos, así como la expresión de genes de anticuerpos en sistemas heterólogos para producción de “fitoanticuerpos” y el uso de los anticuerpos producidos en variados formatos en función del objetivo a conseguir.

El recorrido de la inmunología hasta su estado actual ha sido largo, pero prolífico en desarrollos científicos y tecnológicos y en su transferencia para resolver problemas. Estos hechos se han su-

cedido de manera muy rápida y en pocos años, debido a los sucesivos y significativos avances en inmunología/serología, que han revolucionado el diagnóstico, la detección y la caracterización de virus y bacterias, y han abierto el camino a su aplicación a otros patógenos de plantas.

En España fueron pioneros en la producción y uso de antiseros de interés en Fitopatología durante el periodo 1966-1976: Pedro Urquijo y Juan Rodríguez Sardiña, que los aplicaron a virus de la patata en la Estación de Fitopatología Agrícola de Magedondo, Centro Regional de Investigación y Desarrollo Agrario (CRIDA 01) de la Región Galicia y Norte del INIA (La Coruña, actual CIAM de la Xunta de Galicia); Genoveva Tejerina y Maite Serra, para bacterias, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC)-Madrid; Pascual Cuñat, Enrique Hernández y Eduardo Primo, para el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia (IATA-CSIC); y los laboratorios de virología de Miguel Rubio-Huertos (CIB-CSIC)-Madrid y el de Antonio Peña en el CRIDA 06 del INIA-Madrid para su uso en inmunodifusión doble e inmunoelectromicroscopía.

Pero su mayor aplicación fue para el control de la sanidad de la patata de siembra frente a virus, gracias al esfuerzo y dedicación de Antonio García Orad y Francisco Pérez de San Román, en la Granja Modelo o Estación de Mejora de la Patata de Arkaute, Vitoria (CRIDA 03 del INIA, actual Neiker). A los dos últimos, la SEF les reconoció sus contribuciones en este campo del conocimiento durante el X Congreso Nacional de Fitopatología celebrado en Valencia en 2000.

En 1977, tras mi integración en el CRIDA 07 del INIA (actual IVIA), se creó un laboratorio de Inmunología con animalario donde se han realizado cientos de antiseros en conejo, para uso en Virología y Bacteriología y como servicio para otros centros; desde 1989, anticuerpos monoclonales y, a partir de 1994, anticuerpos recombinantes, pero todo ello se comentará en unas líneas más adelante.

Comenzaré estas historias por una de las técnicas serológicas más usadas en Bacteriología en la década de 1970:

**El recorrido de la inmunología hasta su estado actual ha sido largo, pero prolífico en desarrollos científicos y tecnológicos y en su transferencia para resolver problemas**

## La inmunofluorescencia (IF), una técnica todavía vigente

En su variante denominada IF indirecta se ha utilizado y se sigue aplicando en numerosos laboratorios europeos para la detección de bacterias<sup>[15]</sup>. Esta técnica de inmunomarcado de antígenos fijados en un portaobjetos, utiliza en primer lugar anticuerpos específicos y posteriormente inmunoglobulinas *anti* la especie animal utilizada en primer lugar, marcados con sustancias fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína, ferritina, etc.), que al ser epiiluminadas con luz ultravioleta permiten visualizar las células bacterianas [Figura 3]. Aunque subjetiva, es sensible ( $10^3$  células/ml) pero su especificidad depende de la de los anticuerpos empleados. Se utiliza en España desde 1975 (CIB-CSIC), se le dio un importante impulso a partir de 1977 (Bacteriología del actual

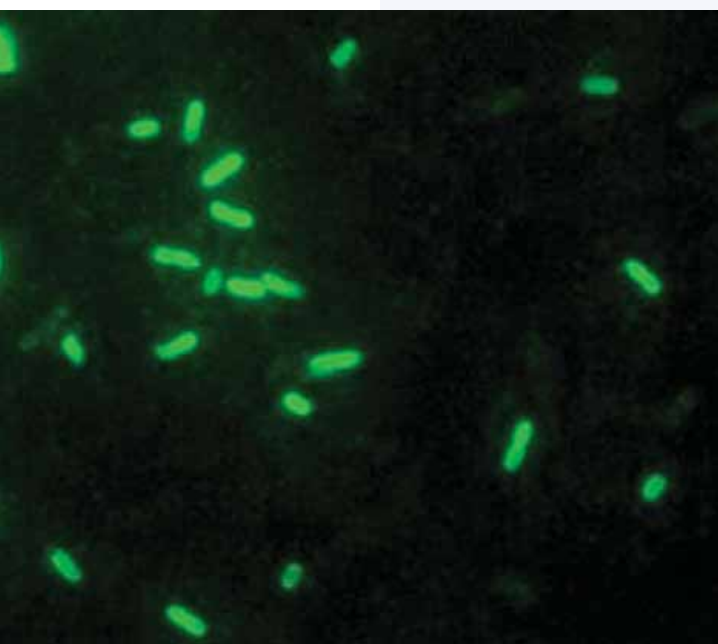


Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta. Células de *Xylophilus ampelinus* de una viña enferma de necrosis bacteriana. Al ser epiiluminadas con UV, aparecen fluorescentes las células bacterianas reconocidas por los anticuerpos específicos.

IVIA) y se continúa utilizando en Laboratorios de Diagnóstico de diferentes CC. AA., principalmente en Aldearrubia (Salamanca) y Neiker (Vitoria) para bacterias de la patata (*Ralstonia solanacearum* y *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*), ya que está recomendada en las Directivas europeas sobre estos patógenos y en protocolos internacionales de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

## La primera revolución en inmunología/serología: el método ELISA

El método inmunoenzimático EIA (acrónimo de “inmunoensayo enzimático”, en inglés) comenzó en 1969 al ponerse a punto la conjugación de enzimas a proteínas mediante el uso del glutaraldehído, para detectar intracelularmente antígenos y anticuerpos. Su uso en microplacas de titulación de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (antes se realizaba habitualmente en tubos), se debe a Voller *et al.* (1974)<sup>[24]</sup> que lo aplicó a la detección de la malaria. En 1976 lo denominaron ELISA (*Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay*) y, en su formato de doble sándwich de anticuerpos (DAS), se aplicó

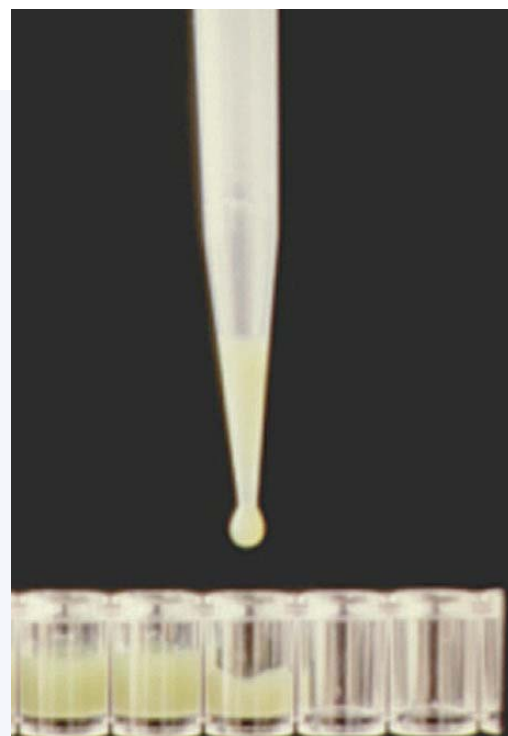


Figura 4. Dispensado de 0,2 ml de extracto bruto/pocillo de placa ELISA (96 pocillos 8x12) con la ayuda de una pipeta automática de pistón y cono desechable de plástico.

por vez primera a la detección de virus de frutales (*Arabis mosaic virus*, ArMV; y *Plum pox virus*, PPV) por Voller *et al.* (1976)<sup>[23]</sup> y Clark y Adams (1977)<sup>[6]</sup>. Posteriormente, se aplicó a otros patógenos de plantas, virus y bacterias, citados en revisiones por Garnsey y Cambra (1991, 1993)<sup>[9,10]</sup>, Cambra *et al.* (1996, 2011)<sup>[3,2]</sup>. En todos los casos se utilizaron extractos brutos no purificados, lo que constituyó una enorme ventaja al no tener que tratar la muestra [Figura 4]. Por cierto, la actual y popular pipeta automática de pistón fue patentada en 1965 por Heinrich Schnitger (Universidad de Marburgo, Alemania) y distribuida inicialmente por Eppendorf y después por Gilson en su variante de volumen variable y puntas desechables de plástico (1972). Esta pipeta jugó un papel clave en el desarrollo



**Figura 5.** Inicialmente, se efectuaba la lectura de placas ELISA visualmente, una vez frenada o paralizada la reacción por adición de 50 microlitros/pocillo de NaOH 10M. También se leían trasvasando el contenido de cada pocillo a una microcubeta para determinar la absorbancia o densidad óptica en un espectrofotómetro a 405 nm para el color amarillo de la fosfatasa alcalina, y obtener así valores ELISA cuantitativos.

de la técnica ELISA. La primeras pipetas automáticas se adquirieron en España en 1974 (Centro Nacional de Biotecnología e INIA-Patología Animal, Madrid) y en 1977 en el IVIA para nuestro laboratorio de serología. Las pipetas multicanal aparecieron en 1978 para adaptarse a la tecnología ELISA en pleno desarrollo en el sector sanitario.

Como curiosidad premonitoria del auge que tendría en España el método ELISA, merece la pena recordar que casualmente fue presentado por vez primera por A. Voller, A. Bartlett y D. Bidwell durante el "3<sup>rd</sup> International Congress of Virology" celebrado en Madrid en 1975. Unos años más tarde, el Dr. Alister Voller fue invitado al INIA de Madrid en 1980, con motivo del 1<sup>er</sup> Simposio ELISA, organizado por José Manuel Sánchez-Vizcaíno y por mí, para divulgar el método en Medicina y Patología Animal y Vegetal. Nos comentó que lo denominaron

así ya que buscaron un acrónimo femenino y que pudiera pronunciarse fácilmente en la mayoría de idiomas. A este primer simposio siguieron otros en 1981 y 1982 organizados por los mismos anteriores y el médico Ignacio Moneo del Hospital Ramón y Cajal-Madrid.

Además, en una serie de cursillos teórico-prácticos, organizados por el INIA, se dio a conocer la técnica a nivel nacional

en distintos ámbitos científicos e industriales y se publicó la primera monografía sobre ELISA en Patología Animal y Vegetal por el INIA (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1981)<sup>[17]</sup>, que despertó gran interés en la época. En 1987 se tradujo al francés e inglés a requerimiento de la Office International des Epizooties (OIE), que lo publicó. Pero aquel era un país con una administración central, coordinada por el Ministerio de Agricultura y el INIA en aspectos relacionados con la Fitopatología y la Sanidad Vegetal, donde era posible realizar fácilmente estas actividades a nivel nacional.

En España, el primer laboratorio ELISA para Fitopa-

tología se montó en septiembre de 1977 en Virología e Inmunología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del CRIDA 07 del INIA (actual IVIA), tras mi incorporación al Centro. Al principio se leían las placas pocillo a pocillo muy rudimentariamente [Figura 5] y después, en 1978, se adquirió un lector automático de placas [Figura 6] y un homogeneizador de vástago Polytron para muestras leñosas [Figura 7], que facilitaron enormemente el trabajo. El segundo laboratorio ELISA se creó en 1978 en la Estación de Mejora de la Patata CRIDA 03 del INIA en Arkaute, Vitoria (actual Neiker), para seleccionar patata de siembra libre de virus. El tercer laboratorio se estableció en 1980 en el Servicio de Sanidad Vegetal de Montequinto (Sevilla) para evaluar la viabilidad de un programa de erradicación del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en Andalucía. El cuarto laboratorio se estableció en 1981 en el Servicio de Sanidad Vegetal de Silla (Valencia) para realizar una amplia prospección de CTV a nivel de tér-



**Figura 6.** El uso de lectores automáticos permitió realizar cinéticas de la reacción y aplicar la técnica ELISA a miles de muestras de una forma objetiva (cuantitativa). En la imagen, el primer lector adquirido en el IVIA en 1978.



**Figura 7.** La preparación de muestras de plantas leñosas en homogeneizadores de vástago tipo Polytron®, permitió analizar más fácilmente extractos y popularizar la detección y diagnóstico en dichos cultivos.

mino municipal en la Comunidad Valenciana; tenía el objetivo de proporcionar consejos a los agricultores en función de la prevalencia del virus, para el cambio de una citricultura clásica a una moderna que debía de estar basada en el uso de variedades libres de virus injertadas sobre patrones seleccionados, sanos y tolerantes al síndrome de tristeza. Se diseñó una verdadera fábrica de realizar análisis ELISA, que era capaz de procesar 900 árboles/día con resultados en 24 horas gracias a un equipo de tres operarios homogeneizadores [Figura 8], lavador y lector automático de placas. El test habitual hasta entonces consistía en inocular por injerto plantas indicadoras de lima mexicana que, tras 6-8 meses de cultivo en invernadero climatizado, permitían saber por sus síntomas, si

el árbol analizado estaba libre de CTV en el momento de toma de la muestra. Como una potente citricultura como la española no se podía permitir exclusivamente un sistema de detección tan lento, se implantó este método serológico y se pasó de analizar unos 600 árboles/año por injerto a 4500 árboles/semana por ELISA. Ello indica claramente alguna de las ventajas de la técnica (rapidez diagnóstica y capacidad de uso masivo). Pero además, el coste de una prueba biológica en plantas indicadoras para análisis de CTV pasó de ser (entonces, en pesetas) el equivalente a unos 48 €/árbol mediante inoculación de plantas indicadoras a 1,3 €/árbol por ELISA con extractos y a 0,12 €/impresión por inmunoimpresión-ELISA, como se relata más tarde.

El método revolucionó la detección y diagnóstico de patógenos de plantas al permitir su aplicación masiva a gran número de muestras de forma simple, cuantitativa (objetiva), semiautomática y económica. Se pudieron analizar miles de muestras durante

prospecciones, campañas de erradicación y reducción de inóculo, controles en viveros y para el control cuarentenario y selección sanitaria de plantas madre sanas. El método se popularizó a partir de 1987 en la práctica totalidad de Laboratorios de Diagnóstico de las CC. AA. y en muchos Centros de Investigación. Adquirió especial relevancia en virología de plantas leñosas y otros cultivos de multiplicación vegetativa, desplazando completamente a otros métodos por su sencillez, robustez, bajo coste y sensibilidad, a pesar de que el uso de anticuerpos policlonales de antiseros, frecuentemente presentaba serios problemas de especificidad, que limitaban su uso extensivo y fiabilidad.

### La tecnología de hibridomas para generar anticuerpos monoclonales específicos

La producción y uso de anticuerpos monoclonales específicos constituyó una segunda revolución en inmunología aplicada a Patología Vegetal, al aportar, además de total especificidad, una gran sensibilidad.



**Figura 8.** Tres operarios con homogeneizadores de vástago en el laboratorio de ELISA diseñado en 1981 en el servicio de Sanidad Vegetal de Silla (Valencia), para análisis masivo de muestras de especies leñosas. Permitía analizar 900 árboles/día.

## El uso de anticuerpos monoclonales específicos constituyó una segunda revolución en inmunología aplicada a Patología Vegetal

La introducción del procedimiento para “inmortalizar” células secretoras de anticuerpos (linfocitos) de animales (ratones) inmunizados, mediante su fusión con células tumorales de mieloma, dio como resultado la tecnología de hibridomas<sup>[17]</sup>, por la que les concedieron el premio Nobel de Medicina en 1984 a los británicos Georges Köhler y Niels Jerne y al argentino César Milstein. Las células de hibridomas combinan dos rasgos parentales: la producción de anticuerpos específicos de un único epítipo o determinante antigénico y el crecimiento y cultivo continuo *in vitro*. Esta sofisticada tecnología permite la producción ilimitada de grandes cantidades del mismo anticuerpo específico de

En 1983-84 se produjeron, patentaron y comercializaron anticuerpos monoclonales específicos de CTV, y de los virus X e Y de la patata y del virus de la sharka

forma reproducible. Se les denominan anticuerpos monoclonales ya que son segregados por un único clon celular y, consecuentemente, son homogéneos. Un anticuerpo monoclonal reconoce o reacciona con un único epítipo del antígeno con el que se inmunizó al ratón Balb/c donante.

La tecnología de hibridomas fue aplicada internacionalmente por muy escasos laboratorios de Patología Vegetal y empresas de diagnóstico en la década de 1980-1990. Las primeras aplicaciones en Fitopatología las realizaron Briand *et al.* (1982)<sup>[1]</sup> y Gugerli y Fries (1983)<sup>[12]</sup>. En España fueron pioneros y los únicos laboratorios que han producido anticuerpos monoclonales útiles para Fitopatología, la empresa Inmunología y Genética Aplicada (Ingenasa) de Madrid, y el Laboratorio de Virología e Inmunología del actual IVIA. La acertada visión del INIA en 1983 llevó a la firma de un convenio entre la entonces empresa pública del grupo INI (Instituto Nacional de Industria) Ingenasa y el actual IVIA, para la producción de anticuerpos monoclonales frente a virus que afectaban a cultivos estratégicos del país. Así en 1983-84 se produjeron, patentaron y comercializaron anticuerpos monoclonales específicos de CTV<sup>[20]</sup>, y después, de los virus X e Y de la patata y del virus de la sharka (PPV). En el actual IVIA se produjeron desde 1989 anticuerpos monoclonales específicos de la bacterias *Xylophilus ampelinus*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum* y otros de *Plum pox virus*-PPV (anticuerpo 5B-IVIA/AMR), todos ellos de referencia internacional y mu-

chos patentados. Muy recientemente las empresas españolas Plant Print Diagnostics SL, en colaboración con Ingenasa, han producido anticuerpos monoclonales específicos frente a la bacteria emergente *Xylella fastidiosa*, patógeno que pone en peligro cultivos estratégicos españoles.

La distribución internacional de los kits de diagnóstico basados en anticuerpos monoclonales ha estado siempre en mano de empresas españolas (Ingenasa, Madrid; Durviz Comercio Exterior, Paterna, Valencia; AMR Lab España, Valencia y Barcelona; y Plant Print Diagnostics SL, Guadassuar, Valencia) aunque los han distribuido las principales empresas internacionales de diagnóstico como Bioreba-Suiza, Adgia-EE.UU., Agritest-Italia y Loewe-Alemania, por su calidad y para completar el catálogo de patógenos de cuarentena.

El impacto de la técnica ELISA basada en anticuerpos monoclonales sobre el diagnóstico, detección e identificación de patógenos de plantas ha sido enorme, confiriéndole especificidad, sensibilidad y anticuerpos caracterizados en lotes idénticos en el tiempo, a un precio/muestra sostenible. Para dar una idea de su repercusión, baste citar el número de análisis realizados con anticuerpos generados en España para algunos patógenos. Para detección y diagnóstico de CTV se estima que se han realizado desde 1985 más de 4,5 millones de análisis ELISA con los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 en España y casi un millón adicional en otros países. Otro anticuerpo monoclonal español que ha tenido mucha aceptación por su es-

pecificidad, avidez y por reaccionar frente a todos los tipos descritos de PPV (sharka) es el 5B-IVIA/AMR y la secuencia del epítipo que reconoce ha sido patentada y publicada. Se estima que se han realizado, desde su obtención en 1993, más de 3,5 millones de análisis en España y unos 5 millones en otros países especialmente en Canadá y EE. UU., donde ha servido de base en los inicios de sus programas de erradicación del virus. Estos anticuerpos monoclonales, así como la mayoría de los producidos en España, han sido validados y aparecen como recomendados en protocolos o estándares de detección y diagnóstico internacionales de la EPPO y de la International Plant Protection Convention (IPPC) de la FAO.

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales producidos en ratón ha permitido configurar distintos formatos de ELISA con anticuerpos policlonales (de conejo o cabra). Estas variantes están muy adaptadas para distintos fines y según la posibilidad de producción o adquisición de anticuerpos de los usuarios. Di-

cha versatilidad ha permitido configurar diversas variantes de ELISA directa (D), indirecta (I), doble sándwich de anticuerpos (DAS) y doble sándwich de anticuerpos indirecto (DASI) también denominado triple sándwich de anticuerpos-TAS<sup>[32]</sup>, aunque las más populares para detección son DAS y DASI con extractos y D (versión inmunopresión).

Para la detección de virus o bacterias, la inmunopresión directa-ELISA (Direct Tissue Blot Immuno Assay-DTBIA o Tissue-print ELISA<sup>®</sup>) permite detectar y localizar antígenos en improntas o impresiones realizadas en membranas de nitrocelulosa. Todo ello sin realizar extractos y mediante un método sencillo que posibilita su ejecución por personal no especializado en técnicas de laboratorio, ya que el kit comercial desarrollado en 1994 por convenio entre Plant Print Diagnostics e IVIA [Figura 9], contiene todo lo necesario incluso testigos impresos en la membrana, para realizar la prueba en horas. Este método, aplicado y desarrollado comercialmente en Espa-

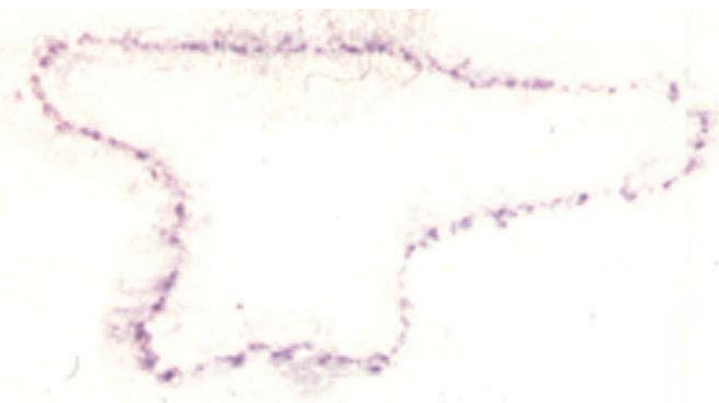


Figura 10. Inmunopresión o Tissue print-ELISA de testigo positivo del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) contenido en el kit. Se observan acúmulos de precipitado violáceo en el floema de la sección impresa de un brote, correspondientes a epítipos de la capsida proteica del virus reconocidos por los anticuerpos monoclonales.

ña, ha popularizado el diagnóstico y detección en viveros de cítricos. El sistema es discreto, muy económico, no precisa laboratorio y pueden revelarse las membranas en un espacio reducido, o incluso ser enviadas por correo para su revelado y es muy útil para localizar proteínas de patógenos, o incluso ARN de doble cadena viral en secciones de tejidos [Figuras 10 y 11]. El método en forma de kit comercial es muy utilizado por viveristas de cítricos para detección de CTV [Figuras 12, 13, 14 y 15] y en otros cultivos como tomate para detección de virus. La lectura de membranas se realiza a simple vista o con ayuda de una lupa binocular, pues fácilmente se distinguen las muestras positivas de las negativas [Figura 16]. Se estima en más de medio millón las plantas/año que son analizadas por los propios viveristas con un coste de unos 20 céntimos/planta. Esta técnica permite el análisis individual de plantas inmediatamente antes de una exportación concertada y garantiza la ausencia del virus



Figura 9. Kits completos de inmunopresión que contienen testigos impresos, membranas, tampones y substrato para revelar las improntas impresas (Imagen cedida por Plant Print Diagnostics de su página web [www.plantprint.net](http://www.plantprint.net)).



**Figura 11.** Inmunolocalización de ARN de doble cadena en el floema de una sección de tallo joven de naranjo dulce infectado por el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), impresa en nitrocelulosa y revelada con anticuerpos anti-polinucleótidos sintéticos por inmunopresión-ELISA.

de la tristeza en el material analizado individualmente. Este sistema validado es más sensible que la técnica ELISA convencional, puesto que no usa extractos que pueden inhibir la reacción o modificar epítomos y no posee riesgos de contaminación cruzada entre muestras.

Otra interesante variante la constituye el denominado enriquecimiento-ELISA-DASI para la detección de bacterias. Dado que la sensibilidad de la técnica convencional a veces no es la deseada, en una fase previa las bacterias de la muestra son incubadas en un medio semiselectivo o selectivo, para su enriquecimiento o multiplicación, que puede efectuarse en la misma microplaca ELISA. Luego, las bacterias diana son capturadas con anticuerpos policlonales y, finalmente, se detectan por anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fosfatasa alcalina, garantizándose así la especificidad de la detección de la bacteria diana aunque esté entre otras enriquecidas. Su sensibilidad es de hasta 10 ufc/ml en la muestra inicial<sup>[15]</sup>.

Actualmente existe una cierta tendencia a utilizar tiras diagnósticas de flujo lateral basadas en anticuerpos de alta especificidad y, a pesar de su menor sensibilidad comparado con ELISA convencional o inmunopresión-ELISA y su elevado precio/muestra, cumplen su papel al ser de uso sencillo y obtener el resultado

en unos minutos incluso en condiciones de campo o aduana. Todas estas últimas posibilidades serológicas, sencillas para el usuario, han sido revisadas y recomendadas<sup>[7]</sup>.

### La última revolución en inmunología: la ingeniería de anticuerpos, clonado y expresión de genes de anticuerpos

La producción de anticuerpos funcionales (inmunoglobulinas G) en plantas transgénicas la describieron Hiatt *et al.* (1989)<sup>[13]</sup>. Al principio de la década de 1990, el clonado y expresión de genes de anticuerpo revolucionó la tecnología de producción de anticuerpos, ya que minimiza

o incluso elimina el uso de animales de laboratorio. En la actualidad, el uso de animales para producir anticuerpos, se regula con normas legales que tienden a evitar su sufrimiento, a incrementar la eficiencia y a disminuir costes de su producción. Un anticuerpo recombinante es cualquier molécula, expresada en un sistema heterólogo, que sea capaz de reconocer o unirse específicamente a epítomos en moléculas antigénicas o no. En contraste con los anticuerpos derivados de antiseros o de cultivo de hibridomas, se hizo patente la posibilidad de generar fragmentos de anticuerpo o anticuerpos completos recombinantes sintéticamente, e incluso su uso para inmunomodular la infección por patógenos en plantas transgénicas que los expresen. Una



**Figura 12.** Toma de muestras en viveros Valencia de cítricos realizada por los viveristas. Hojas de la planta madre a analizar (4-10 según tamaño de la planta) son insertadas en un alambre para, posteriormente en laboratorio, proceder a la impresión de una sección fresca de su peciolo y su revelado.





**Figura 13.** Ristra de hojas de cítricos insertadas en alambre para su análisis por inmunopresión-ELISA en laboratorio. La imagen da idea del número de muestras que es posible analizar por esta técnica de una forma sencilla, sensible y económica.

completa revisión del tema ha sido publicada por la SEF<sup>[11]</sup> y merece la pena citar las contribuciones españolas de Terrada *et al.* (2000)<sup>[19]</sup> [Figura 17], que demostró que se pueden generar anticuerpos recombinantes e incluso conjugados, que muestran la misma o mayor eficacia de reacción en ELISA que los anticuerpos convencionales. La interferencia de anticuerpos recombinantes con la infección viral la demostraron Tavladoraki *et al.* (1993)<sup>[18]</sup> y fue aplicada en nuestro país por Esteban *et al.* (2003)<sup>[8]</sup> con fragmentos scFv de anticuerpo contra la ARN replicasa Nib de PPV, y por Cervera *et al.* (2010)<sup>[5]</sup> en limas mexicanas trans-



**Figura 14.** Toma de muestras en Viveros Alcanar de cítricos: dos operarios toman muestras que son impresas en invernadero y posteriormente reveladas por los mismos operarios (1400 plantas/día) mediante inmunopresión-ELISA.

génicas resistentes al CTV, por expresión de una versión recombinante de los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5.

Pero no todo lo que reluce es ELISA. Para finalizar las loas a la serología hay que reseñar que también son frecuentes los revelados serológicos,

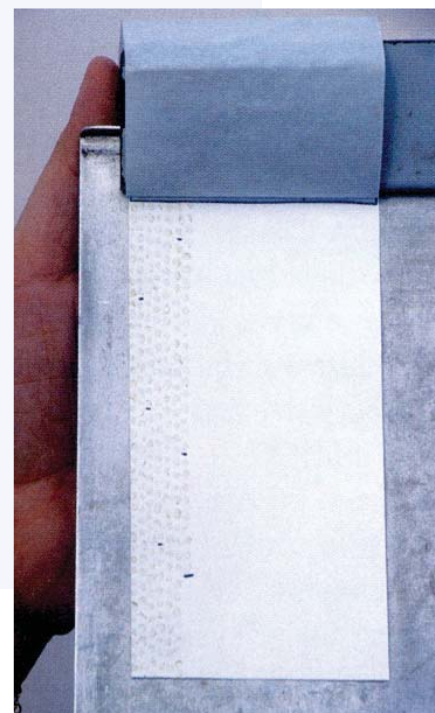
tras separación electroforética o inmunoelectrotransferencia con anticuerpos marcados con digoxigenina, y que durante muchos años se realizaron métodos de captura con anticuerpos previos a PCR convencional (inmuncaptura-PCR), o se siguen empleando anticuerpos marcados con oro coloidal o metales pesados en inmunoelectromicroscopía.

### Epílogo o desenlace

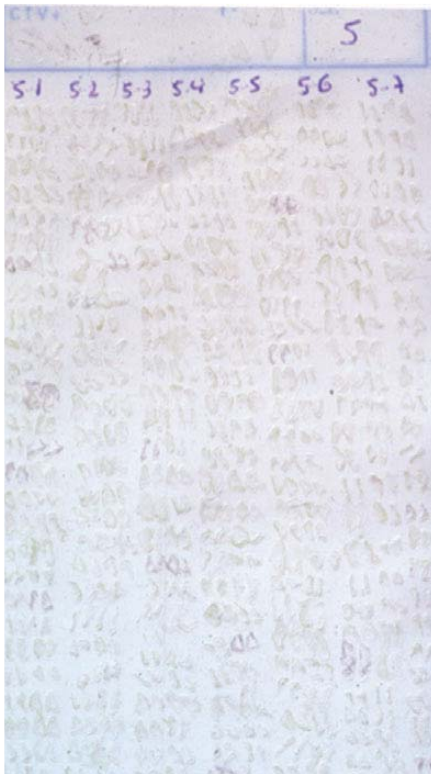
La demanda e interés de la inmunología/serología en Fitopatología, llevó a la organización en el IVIA de dos cursos internacionales del programa BRIDGE patrocinado por la

EU. Sin embargo, el riesgo es que en una futura edición de esta historia comencemos por “Érase una Patología Vegetal con escasos fitopatólogos duchos y expertos en serología”, que inexorablemente llevará al análisis de un menor número de muestras

de forma sostenible y me temo que esto refleja la realidad vigente. Lo actualmente popular son las técnicas de amplificación molecular que tienen indudables ventajas y se divulga que son muy sensibles, pero el coste de su sensibilidad son los falsos positivos. Claro está que el coste de la especificidad serológica puede ser la presencia de falsos negativos. No obstante, en el equilibrio está la virtud (precisión o exactitud) y los altos valores predictivos de positivos y negativos<sup>[16,21,22]</sup>. Por ello, la EPPO requiere, para confirmar casos críticos o en transacciones económicas de alto valor o para la publicación oficial de la introducción de un nuevo patógeno, realizar los análisis por dos métodos basados en distintos principios biológicos. Normalmente, en virología, por una técnica basada en



**Figura 15.** Aspecto de una membrana en la que se han ido impresionando secciones frescas de peciolo de hoja (dos/plantón de vivero) en campo o invernadero. Se suelen imprimir de 1000 a 1100 peciolo/membrana de 7x13 cm.



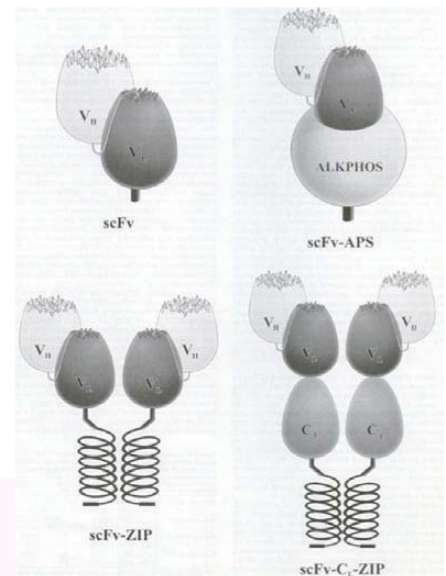
**Figura 16.** Membrana revelada en la que se pueden apreciar la impresión (2 brotes/planta x 2 impresiones/brote que resultan en 4 improntas/planta) de secciones frescas de brotes. Las muestras positivas muestran coloración. Normalmente los viveristas realizan unas 820 impresiones de brote/membrana que corresponde al análisis de 205 plantas/membrana. Es más popular el uso de peciolo de hoja pues supone más muestras (aproximadamente 1050/membrana) y es menos destructivo para la planta.

PCR y por una serológica, a ser posible con anticuerpos monoclonales específicos.

En España el IVIA ha liderado la campaña para comparar y validar las denominadas técnicas moleculares con las serológicas con parámetros de diagnóstico adecuados (no solo sensibilidad y especificidad). La conclusión es que, frecuentemente, el criterio de referencia alterna entre una técnica molecular o una serológica, especialmente si se tiene en cuenta para la elección de una técnica de detección la prevalen-

cia del patógeno, como se efectúa en Sanidad Humana y Veterinaria. Unos ejemplos claros son los evaluados para CTV y PPV por algunos autores<sup>[16,4,21,22]</sup>.

Frente a una alta prevalencia esperada del patógeno, suele ser más adecuado emplear la técnica más sensible; pero si se espera una baja prevalencia, es más conveniente usar la técnica más específica. Esto es justo lo contrario de lo que se suele aplicar en muchos laboratorios de Patología Vegetal al diseñar una prospección. Igualmente, si se desea evitar la entrada de un patógeno en frontera (cuarentena), la aplicación de la técnica más sensible es recomendable aunque pueda conducir a falsos positivos. Otros criterios son el económico y de cribado: la realización de numerosos controles por la técnica más específica es más efectiva, para conocer la realidad, que la realización de escasos análisis por la técnica más sensible. Ello atañe actualmente a la detección de *Xylella fastidiosa*, por ejemplo, donde se realizan análisis casi exclusivamente por PCR en tiempo real (aproximadamente a 7 €/muestra sin contar amortización de equipos) y se efectúan escasas pruebas serológicas de muy inferior coste y gran sencillez, especialmente si se emplean reactivos específicos como los anticuerpos monoclonales ahora disponibles. Esta filosofía serológica permitiría analizar rutinariamente miles de plantas de vivero, incluso privadamente y, tras resultados negativos, realizar algunos tests por PCR para certificar la ausencia del patógeno en una amplia zona o vivero y avanzar así en el conocimiento rápido de la situación para el control efectivo



**Figura 17.** Representación figurada de las proteínas globulares obtenidas por ingeniería genética que conforman un fragmento scFv de anticuerpo recombinante (V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, cadena variable ligera y pesada, respectivamente enlazados por un péptido de unión), de conjugados recombinantes con fosfatasa alcalina (alkaphos) como producto de fusión y de minianticuerpos estabilizados con cremallera de leucina (zip) (Tomada de Terrada et al. 2000, *Phytopathology* 1013, 1337-1344; acceso abierto).

de las enfermedades que causa y poder tomar las medidas más adecuadas para su prevención, contención y erradicación, con base científica, que no solamente política.

La pasión me ha desbordado y temo que me he extendido más de lo aconsejado y deseable. Por ello pido disculpas a los pacientes lectores y a los editores de la SEF. Gracias a todos los que han contribuido a ensanchar los conocimientos sobre la inmunología/serología en España y, especialmente, a los que durante los últimos 45 años han inmunizado animales, generado anticuerpos monoclonales o recombinantes y comparado técnicas en los laboratorios del IVIA, Ingenasa y en los laboratorios oficiales de Diagnóstico de las CC. A.A.

## REFERENCIAS

- <sup>1</sup> Briand, J. P., Al-Moudallal, Z. y van Regenmortel M. H. V. (1982). "Serological differentiation of tobamoviruses by means of monoclonal antibodies". *J. Virol. Methods* **5**: 293-300.

---
- <sup>2</sup> Cambra, M. et al. (2011). "Immunology and immunological assays applied to the detection, diagnosis and control of fruit tree viruses". Capítulo 55, pp. 303-313. En: *Virus and virus-like diseases of pome and stone Fruits*. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, EE. UU. 429 pp.

---
- <sup>3</sup> Cambra, M., Gorris, M. T. y Terrada, E. (1996). "Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus". Capítulo 7, pp. 207-254. En: *Patología Vegetal*. G. Llácer, M. M. López, A. Trapero, A. Bello (Eds.). SEF, Phytoma-España, Valencia. 1165 pp.

---
- <sup>4</sup> Capote, N. et al. (2009). "Direct sample preparation methods for detection of Plum pox virus by real-time RT-PCR". *Int. Microbiol.* **12**: 1-6.

---
- <sup>5</sup> Cervera, M. et al. (2010). "Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to Citrus tristeza virus confers virus resistance". *Transgenic Res.* **19**: 1001-1005.

---
- <sup>6</sup> Clark, M. y Adams, A.N. (1977). "Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses". *J. Gen. Virol.* **34**: 475-483.

---
- <sup>7</sup> De Boer, S. y López, M. M. (2012). "New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring". *Ann. Rev. Phytopathol.* **50**: 197-218.

---
- <sup>8</sup> Esteban, O. et al. (2003). "Generation and characterisation of functional recombinant antibody fragments against RNA replicase N1b from plum pox virus". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**: 167-175.

---
- <sup>9</sup> Garnsey, S. M. y Cambra, M. (1991). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens" Capítulo Part III, Laboratory methods for detection of CGTPs, pp. 193-216. En: *Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis*. C. N. Roistacher (Ed.). International Organization of Citrus Virologists (IOCV) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Distribution and Sales Section. Roma. 286 pp.

---
- <sup>10</sup> Garnsey, S. M. y Cambra, M. (1993). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)", Capítulo Serology, pp. 169-192. En: *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. G. P. Martelli (Ed.). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Distribution and Sales Section. Roma. 263 pp.

---
- <sup>11</sup> Gil, M. et al. (2008). "Anticuerpos recombinantes en Patología Vegetal". pp 437-455. En: *Herramientas biotecnológicas en Fitopatología*. Capítulo 24. Vicente Pallás, Carolina Escobar, Pablo Rodríguez Palenzuela, José F. Marcos (Eds.). SEF, Mundi-Prensa, Madrid. 464 pp.

---
- <sup>12</sup> Gugerli, P. y Fries, P. (1983). "Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for detection". *J. Gen. Virol.* **64**: 2471-2477.

---
- <sup>13</sup> Hiatt, A., Cafferkey, R. y Bowdish, K. (1989). "Production of antibodies in transgenic plants". *Nature* **342**: 76-78.

---

- <sup>14</sup> Köhler, G. y Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity". *Nature* 256: 595-597.
- 
- <sup>15</sup> López, M. M., Palacio-Bielsa, A. y Roselló, M. (2018). "Diagnóstico y detección de bacterias fitopatógenas". pp 125-155. En: *Enfermedades de plantas causadas por bacterias*. M. M. López, E. Murillo, E. Montesinos, A. Palacio-Bielsa (Eds.). SEF-Bubok, Madrid. (pendiente de publicarse).
- 
- <sup>16</sup> Olmos, A. et al. (2008). "An evidence-based approach to Plum pox virus detection by DAS-ELISA and RT-PCR in dormant period". *Virology Res. Treatment* 1: 1-8.
- 
- <sup>17</sup> Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Cambra, M. (1981). *Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal*. Monografías INIA nº 29. INIA, Madrid. 57 pp.
- 
- <sup>18</sup> Tavladoraki, P. et al. (1999). "A single-chain antibody fragment is functionally expressed in the cytoplasm of both *Escherichia coli* and transgenic plants". *Eur. J. Biochem.* 262: 617-624.
- 
- <sup>19</sup> Terrada, E. et al. (2000). "Fully 'recombinant enzyme-linked immunosorbent assays' using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of Citrus tristeza virus". *Phytopathology* 1013: 1337-1344.
- 
- <sup>20</sup> Vela, C. et al. (1986). "Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis". *J. Gen. Virol.* 67: 91-96.
- 
- <sup>21</sup> Vidal, E. et al. (2012a). "Estimation of the accuracy of two diagnostic methods for the detection of Plum pox virus in nursery blocks by latent class models". *Plant Pathol.* 61: 413-422.
- 
- <sup>22</sup> Vidal, E. et al. (2012b). "Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of Citrus tristeza virus. A model for other plant pathogens". *Phytopathology* 102: 114-121.
- 
- <sup>23</sup> Voller, A. et al. (1976). "The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *J. Gen. Virol.* 33: 165-167.
- 
- <sup>24</sup> Voller, A. et al. (1974). "A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria". *Bull. Wld. Hlth. Org.* 51: 209-211.
- 

