

ADAPTACION DE UNA TECNICA DE INMUNOSORBENCIA (ELISA) A LA DETECCION DEL VIRUS DEL RAYADO FINO DEL MAIZ EN SU INSECTO VECTOR¹ /

CARMEN RIVERA*
RODRIGO GAMEZ*

Summary

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adapted for the detection of maize rayado fino virus (RFV) in its insect vector Dalbulus maidis. Optimization of experimental conditions for the assay included the use of anti-RFV immunoglobulin G (IgG) purified by ion exchange chromatography and the determination of critical concentrations of the enzyme-IgG conjugate, Tween 20 and bovine serum albumen. Under the experimental conditions described in this work, it was possible to detect viral antigens in individual leafhoppers at concentrations of less than 1.0 ng.

Introducción

El virus del rayado fino del maíz (VRF), de amplia distribución en los trópicos americanos (7), es transmitido por el cicadélido *Dalbulus maidis* DeLong & Wolcott de manera persistente, multiplicándose también en este insecto vector (6, 13).

El estudio del ciclo biológico del VRF en *D. maidis* ha requerido del desarrollo y adaptación de métodos directos de detección del virus en los tejidos del insecto. Las técnicas serológicas convencionales de inmunoprecipitación no han permitido su detección, aparentemente debido a la baja concentración que alcanza el virus en los órganos del vector. Por otra

parte la técnica de inmunosorbencia con ligados enzimáticos conocida como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) descrita originalmente por Voller *et al.* (14), ha sido utilizada en numerosos estudios efectuados con muy diversos virus de plantas. Debido a su alta sensibilidad se ha usado particularmente en casos en que estos virus alcanzan en los tejidos infectados concentraciones menores a las detectables por los métodos serológicos usuales (3).

La técnica de ELISA ha sido aplicada exitosamente a la detección del VRF en plantas e insectos en Costa Rica (8, 13) y los Estados Unidos (2, 9). En el presente trabajo se describen, en forma detallada las condiciones experimentales del sistema de ELISA optimizado, que ha permitido la detección del VRF en *D. maidis* en concentraciones menores a 1 ng.

Materiales y métodos

Aislamiento y purificación del virus

Se utilizó el mismo aislamiento del VRF descrito por Gámez (5, 6). El virus fue mantenido en plantas de maíz, cultivar Tico H4 y la transmisión del virus de una planta a otra se realizó por medio de insectos vectores de la especie *D. maidis* en la manera anteriormente descrita (6). El virus fue purificado a partir de tejido vegetal fresco de acuerdo a métodos previamente establecidos (7, 10). La concentración del virus purificado fue determinada por el método de Lowry (11).

¹ Recibido para su publicación el 8 de abril de 1983.
Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica y la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica. Forma parte del proyecto "Biología y Características del Virus del Rayado Fino del Maíz" y constituye una sección de los resultados presentados en una tesis del primer autor para optar al grado de Magister Scientiae de la Universidad de Costa Rica.

Los autores agradecen al Dr. Gabriel Macaya su asesoramiento en los aspectos bioquímicos y en la orientación general de este trabajo; al "International Center for Research and Medical Training" (LSU-ICMRT) y a la Sra. Kirsten Visoná su colaboración en el desarrollo de los trabajos inmunológicos y a los Drs. Edgardo Moreno y Pedro León sus comentarios sobre esta investigación.

* Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica.

Preparación del antisuero

El antisuero contra el VRF se preparó en conejos. Todas las dosis se aplicaron en forma intramuscular en las patas traseras del animal, de acuerdo al siguiente esquema de inmunización: se inyectó una primera dosis de 3 mg de antígeno puro, emulsionado en 1 ml de adyuvante de Freund completo (Difco). Diez días después se aplicó una segunda dosis de 3 mg de antígeno emulsionado en 1 ml de adyuvante de Freund incompleto y diez días más tarde una tercera dosis de 6 mg de antígeno en 1 ml de alginato de sodio como adyuvante. Dos meses después de la tercera dosis, se inyectó un refuerzo de 6 mg de antígeno en 1 ml de adyuvante de Freund completo. A partir de la tercera dosis y cada diez días, el animal fue sangrado de la vena marginal de la oreja, determinándose el título del suero por reoforesis (12). Un mes después de aplicado el refuerzo, se sangró el animal en su totalidad, directamente del corazón. El antisuero obtenido alcanzó un título de 1:128.

Purificación de la Inmunoglobulina G (IgG)

La IgG anti-VRF se purificó por cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-Sephadex A-50, a partir del antisuero preparado en conejos. Fue necesario determinar la fuerza iónica a la cual la fracción IgG no era retenida por el gel intercambiador, lo cual se hizo de acuerdo al siguiente método: 1) la IgG del suero fue precipitada con sulfato de sodio al 18% p/v según el método descrito por Fudenberg (4); 2) el precipitado obtenido se resuspendió en un tampón de fosfato de potasio 0.2 M, pH 6.3 (KP), dializándose por 24 horas contra un tampón KP 0.02 M y 3) de inmediato se cargó en una columna de DEAE Sephadex A-50 equilibrada en tampón KP 0.02 M, condición en que las proteínas séricas son retenidas; 4) el material retenido se eluyó con un gradiente de concentración de 0.02 a 0.2 M KP. Las fracciones fueron separadas en un analizador de ultravioleta ISCO Modelo UA-5, midiéndose su índice de refracción a 25°C en un refractómetro de Abbé (Bausch & Lomb); 5) la molaridad de cada fracción fue calculada a partir de su índice de refracción interpolando entre los valores de los tampones 0.02 y 0.2 M KP. (Figura 1); 6) Se determinó por reoforesis qué fracciones eran positivas contra el antígeno viral encontrándose que la totalidad de la IgG anti-VRF eluía a una concentración 0.06 M (Figura 1).

Una vez determinada la concentración a que eluía la IgG se hizo una purificación de prueba de ésta de acuerdo al método descrito en la Figura 2, el cual fue luego utilizado como método de rutina. El fraccionamiento fue seguido por una inmunoelectroforesis en

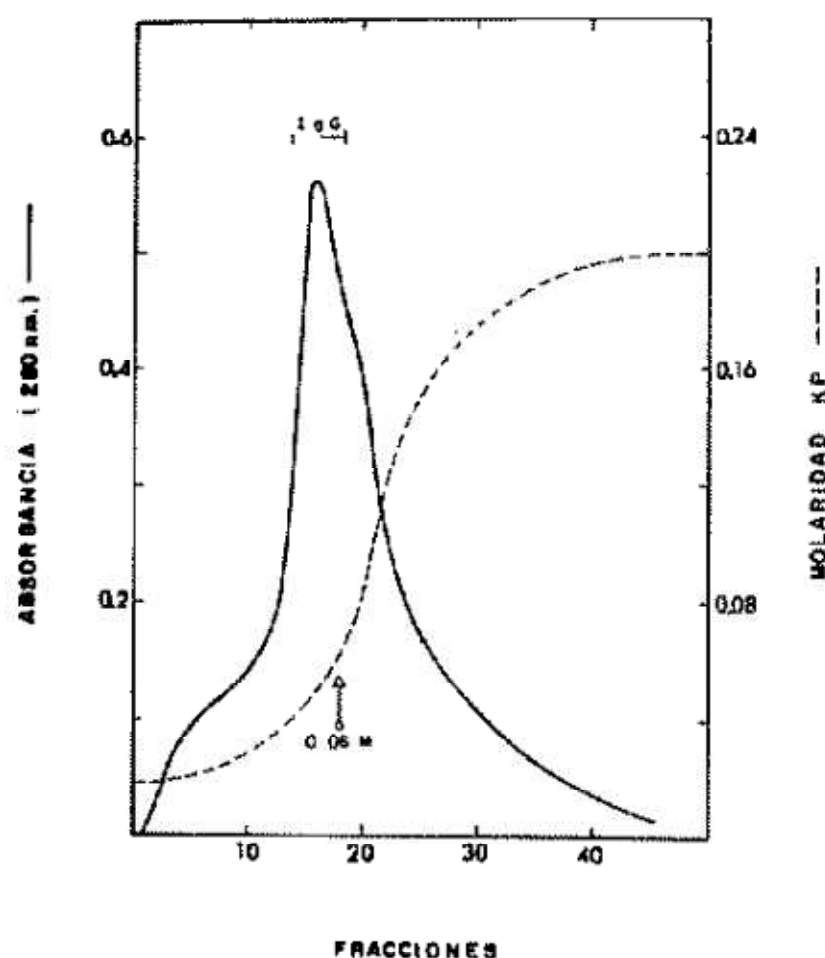


Fig. 1. Elución de la fracción IgG de un suero anti-VRF, de una columna de intercambio iónico DEAE-Sephadex A-50. La elución de la IgG se hizo con un gradiente de molaridad (---) de un tampón de fosfato de potasio (KP) pH 7.2 de 0.02 M a 0.2 M. La absorbancia (—) de las fracciones se determinó a 280 nm. La IgG eluye de 0.03 M a 0.06 M (◀—▶); las fracciones comprendidas en ese rango reaccionaron con el VRF por reoforesis.

agar (1), mediante la cual se comprobó la actividad biológica anti-VRF y la pureza de la fracción IgG obtenida (Figuras 3, 4).

Preparación de los insectos

Para la obtención de insectos infectados con el VRF se empleó el método antes descrito (6). Ninfas de tercer y cuarto estadio se alimentaron durante un día en hojas de maíz infectado (período de adquisición del virus), transfiriéndose luego por 25 días (período de incubación) a plantas sanas de maíz. Los insectos así tratados se denominaron "expuestos" y fueron utilizados en las diferentes pruebas realizadas para calibrar el método de ELISA.

Preparación del conjugado fosfatasa alcalina - IgG

Para la preparación del conjugado, 1 mg de fosfatasa alcalina (Sigma, Type VII) fue disuelto en 1 ml de IgG, de una concentración de 1 mg/ml, dializándose la preparación contra un tampón de fosfato 0.01 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M (PBS) por 24 horas a 4°C. A esta preparación se le agregó glutaraldehído

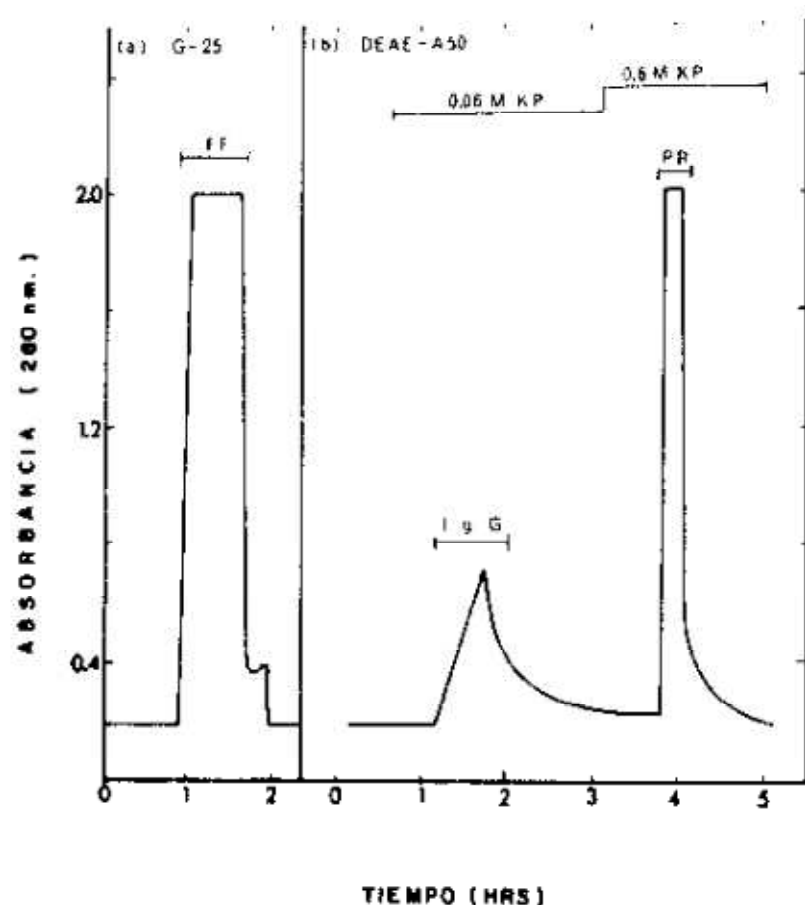


Fig. 2. Purificación de la fracción IgG en columnas de intercambio iónico. El suero completo anti-VRF se filtró a través de una columna de Sephadex G-25 M (a). La fracción filtrada (FF) se pasó por una columna de DEAE-Sephadex A-50 (b) equilibrada con el tampón KP 0.06 M, eluyendo directamente la fracción IgG. Las proteínas séricas (PR) que quedaron retenidas fueron eluidas en una 2a. etapa con un tampón KP 0.6 M. La absorbencia de las fracciones se determinó a 280 nm.

hasta alcanzar una concentración final de 0.2%, incubándose luego por 2 horas a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), sometiéndose a diálisis por 14 horas contra PBS y agregándosele luego albúmina bovina al 1%. La preparación fue envasada en alícuotas y se guardó a 4°C .

Adaptación del Método de ELISA

La prueba de ELISA se realizó con algunas modificaciones en la forma descrita por Voller *et al.* (14). Los platos de microtitulación de poliestireno (Cooke u 129 A) se prepararon adsorbiendo IgG anti-VRF a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un tampón de carbonato de sodio 0.01 M pH 9.6. Los platos sellados se colocaron 6 días en cámara húmeda a 4°C , lavándose luego tres veces con un tampón de fosfato 0.01 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M; Tween-20 0.05% (PBST 0.05) y secándose a temperatura ambiente. Seguidamente, los platos fueron incubados por 14 horas a 4°C con un tampón de carbonato de sodio 0.01 M, pH 9.6, polivinil pirrolidona 2%, albúmina bovina 0.1%. Se lavaron tres veces con PBST 0.05, se seca-



Fig. 3. Inmunoelectroforesis en agar del suero e IgG anti-VRF. Las muestras del antisuero completo (1) e IgG (2) anti-VRF se corrieron por inmunoelectroforesis 2 h a 50 v y 30 mA. El antígeno puro del VRF se colocó posteriormente en el canal central, dejándose reaccionar por 24 h, demostrándose la actividad biológica anti-VRF de la fracción IgG.



Fig. 4. Inmunoelectroforesis en agar de la IgG y las proteínas séricas retenidas (PR). Las fracciones obtenidas de las columnas de intercambio iónico (Fig. 2), correspondientes a la IgG (1) y a las proteínas séricas retenidas (PR) (2) de un suero anti-VRF se corrieron por inmunoelectroforesis 2 h a 50 v y 30 mA. En el canal central se colocó un suero completo anti-conejo dejándose reaccionar por 24 h. La fracción IgG no presentó contaminación con las proteínas presentes en la otra fracción (PR).

ron y guardaron a 4°C en bolsas plásticas. Para la detección del antígeno viral, los platos sensibilizados se mantuvieron por 14 horas a 4°C con las muestras, lavándose tres veces con PBST 0.5, secándose inmediatamente. Luego se incubaron con el conjugado enzima-IgG a una dilución de 1:500 en un tampón PBS con diferentes concentraciones de Tween-20 y albúmina, a 37°C y por diferentes períodos de tiempo. Fueron lavados de nuevo tres veces con PBST 0.5 agregándose luego el sustrato por períodos diferentes. Como sustrato se usó p-nitrofenil fosfato (Sigma Chemicals) a una concentración de 1 mg/ml en un tampón dietanolamina 1 M, pH 9.8 (tampón sustrato); los valores de ELISA se obtuvieron leyendo la absorbencia de éste a 405 nm en un espectrofotómetro 20 Beckman.

Resultados

I. Purificación de la IgG

Los resultados de la inmunoelectroforesis de las fracciones no retenida y retenida en la columna de intercambio iónico se observan en las Figuras 3 y 4. La fracción no retenida, al probarla contra el antígeno viral, produjo una sola banda correspondiente a la IgG pero más débil que la presentada por el antisuero completo. La misma fracción contra el suero anticonejo comercial (Sigma Chemicals) dio una ban-

da correspondiente a la IgG mientras que la fracción retenida dio una serie de bandas de precipitación correspondientes al resto de las proteínas séricas, no obteniéndose ninguna banda de IgG.

II. Adaptación del Método de ELISA

A. Recubrimiento de platos y concentración óptima del conjugado. En estudios preliminares se determinaron como óptimas una concentración de IgG de 1 µg/ml para el recubrimiento de los platos, y una dilución del conjugado de 1:500.

B. Eliminación de las reacciones inespecíficas producidas por extractos de insectos.

1— Efectos de diferentes concentraciones de Tween 20 y albúmina en la preparación de insectos.

Cuatro grupos de insectos sanos fueron macerados a diluciones de 1:200 p/v en PBST 0.05, PBST 0.1, PBST 0.2 y PBST 0.5 respectivamente. El grado de reacción inespecífica fue notoriamente más bajo con el PBSAT 0.5 que con los otros tratamientos (Cuadro 1).

2— Efecto del Tween 20 y la albúmina como diluyente del conjugado. Los insectos sanos fueron macerados individualmente en PBSAT 0.5 a una dilución de 1:200 p/v. El conjugado IgG-enzima fue diluido 1:500 en el mismo tampón, a diferencia de pasos anteriores en que se preparaba en PBST 0.05. Los resultados obtenidos aparecen en el Cuadro 2, en el que se aprecia que la reacción inespecífica tuvo valores insignificantes.

3— Efecto del Tween 20, y la albúmina sobre el antígeno viral. Se utilizaron dos preparaciones puras del antígeno viral, diluidas 1:500 en un PBST 0.5 y

Cuadro 1. Efecto de diferentes concentraciones de Tween 20 y albúmina en la reacción inespecífica obtenida con extractos de insectos sanos por el método de ELISA.

Concentración (%)		Absorbencia a 405 nm** ($\bar{x}$)
Tween	Albúmina	
0.05	—	0.50 ± 0.127
0.10	—	0.30 ± 0.034
0.20	—	0.28 ± 0.015
0.50	4	0.23 ± 0.015

* Los insectos fueron macerados en grupos a una dilución 1:200 p/v en PBS que contenía diferentes concentraciones de Tween y albúmina.

** Promedio de tres repeticiones.

Cuadro 2. Efecto del PBSAT 0.5 como diluyente del conjugado IgG-enzima y de los extractos de insectos sanos en las reacciones obtenidas en la prueba de ELISA*.

Experimento No.	No. insectos probados	Absorbencia 405 nm ($\bar{x}$)	
		Extracto de insectos	Conjugado
1	6	0.01 ± 0.015	0.06
2	36	0.00	
3	12	0.01 ± 0.017	
4	18	0.00	

* Los insectos fueron macerados individualmente a una dilución 1:200 p/v en un tampón de fosfato 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15 M, Tween 20 0.5%, albúmina 4% (PBSAT 0.5). El mismo tampón fue usado como diluyente del conjugado IgG-enzima.

PBSAT 0.5. Ambas se probaron con el conjugado 1:500 preparado en un PBSAT 0.5. Se observó que cuando el antígeno era preparado en el tampón que contenía albúmina daba mejores resultados que cuando era preparado en el tampón sin albúmina, ya que la absorbencia fue notoriamente mayor en el primer caso (Cuadro 3).

C. Determinación de los tiempos óptimos de incubación para el conjugado IgG-enzima y el sustrato.

Para determinar los tiempos óptimos de incubación para el conjugado y el sustrato, fueron utilizados platos recubiertos con IgG a una concentración de 1 µg/ml e incubados por 2 horas a 37°C con un antígeno viral a una dilución de 1:128.000 y extracto de insectos sanos individuales 1:200. Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

1) un tiempo de incubación para el conjugado de 12 h a 4°C contra diferentes tiempos de incubación del sustrato (1/2, 1, 2, 3, 4, 5 h) a 37°C. Tanto en los insectos sanos como en el conjugado, conforme aumentó el tiempo de incubación del sustrato aumentó la reacción inespecífica (Cuadro 4). 2) Dos diferentes periodos de incubación para el conjugado como para el sustrato (Cuadro 5). Esto permitió establecer como óptimos los periodos de incubación de 2 h tanto para el conjugado como para el sustrato.

III. Detección del virus en los insectos

Los resultados de las pruebas de detección del virus en insectos expuestos al antígeno viral se encuentran en el Cuadro 6. Los insectos fueron macerados individualmente a una dilución 1:200 p/v en PBSAT 0.5 y probados por ELISA utilizando las condiciones óptimas descritas anteriormente. Se

Cuadro 3. Efecto del Tween 20 y la albúmina sobre el antígeno viral en la prueba de ELISA.

Antígeno*	Tratamiento	Absorbancia a 405 nm** ($\bar{x}$)
A	PBSAT 0.5	1.45 $\pm$ 0.061
	PBST 0.5	1.24 $\pm$ 0.046
B	PBSAT 0.5	1.20 $\pm$ 0.040
	PBST 0.5	1.09 $\pm$ 0.011

* Se utilizaron dos antígenos virales de diferentes purificaciones (A y B), cada uno de ellos diluido 1:500 en un tampón de fosfato 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15 M, Tween 20 0.5% con albúmina al 4% (PBSAT 0.5) y sin albúmina (PBST 0.5).

** Promedio de tres repeticiones

tomaron como positivos para antígeno viral aquellos valores de absorbencia a 280 nm mayores que la media ($\bar{x}$) de los insectos sanos más tres desviaciones estándar (3s) ($p = 0.003$). El antígeno viral fue detectado en 23 de los 62 insectos "expuestos", obteniéndose valores de absorbencia a 405 nm que oscilaron entre 0.06 y 1.76, correspondientes a concentraciones estimadas de proteína de 0.2 ng a 5.09 ng por insecto.

Discusión

El método de ELISA ha sido utilizado en los últimos años en la detección de virus de plantas principalmente debido a su alta sensibilidad. Nuestros resultados indican que este método fue lo suficientemente sensible para detectar el VRF en concentraciones extremadamente bajas en insectos individuales (Cua-

Cuadro 4. Determinación del efecto del tiempo de incubación del sustrato en la prueba de ELISA*.

Tiempo de incubación del sustrato (horas)	Absorbencia a 405 nm** ($\bar{x}$)			
	Antígeno + conjugado	Insectos sanos + conjugado	Conjugado	Sustrato
1/2	0.71 $\pm$ 0.034	0.06 $\pm$ 0	0.06 $\pm$ 0	0
1	1.10 $\pm$ 0.025	0.11 $\pm$ 0.005	0.11 $\pm$ 0.005	0
2	1.82 $\pm$ 0.032	0.26 $\pm$ 0.057	0.23 $\pm$ 0.059	0
3	3.10 $\pm$ 0.123	0.87 $\pm$ 0.420	0.32 $\pm$ 0.017	0
4	4.04 $\pm$ 0.123	0.90 $\pm$ 0.157	0.34 $\pm$ 0.016	0
5	4.86 $\pm$ 0.129	0.77 $\pm$ 0.123	0.40 $\pm$ 0	0

* Se utilizó un período de 12 horas para la incubación de conjugado

** Promedio de tres repeticiones

Cuadro 5. Comparación de diferentes tiempos de incubación del sustrato y del conjugado IgG-enzima en la prueba de ELISA.

Tiempo incubación del conjugado (h)	Absorbencia a 405 nm** ($\bar{x}$)					
	Tiempo incubación sustrato (h)					
	1			2		
	Antígeno	Insecto sano	Conjugado	Antígeno	Insecto sano	Conjugado
1	0.22 $\pm$ 0.060	0	0.01 $\pm$ 0.023	0.54 $\pm$ 0.034	0.03 $\pm$ 0.012	0.02 $\pm$ 0.000
2	0.76 $\pm$ 0.147	0	0.03 $\pm$ 0.042	1.15 $\pm$ 0.092	0.04 $\pm$ 0.012	0.06 $\pm$ 0.023

* Se utilizaron períodos de 1 y 2 h tanto para la incubación del sustrato como para la incubación del conjugado.

** Promedio de tres repeticiones

Cuadro 6. Detección del virus del rayado fino del maíz en insectos por el método de ELISA.

Experimento No.	No. de insectos positivos/No. de insectos probados*		Absorbencia a 405 nm ($\bar{x}$)	
	Expuestos**	Sanos	Expuestos	Sanos
1	5/22	0/15	0.168 $\pm$ 0.070	0.018 $\pm$ 0.026
2	8/20	0/20	0.477 $\pm$ 0.405	0.013 $\pm$ 0.014
3	10/20	0/20	0.558 $\pm$ 0.573	0.029 $\pm$ 0.014

* Insectos positivos por ELISA sobre el total de insectos probados. Se tomaron como positivos los valores de absorbencia $\bar{x} + 3s$ de insectos sanos ($p = 0.003$).

** Los insectos expuestos por 24 h a plantas infectadas fueron probados por ELISA a los 25 días después de la adquisición del virus.

dro 6). Un aspecto que se considera fundamental en la exitosa aplicación del método fue la utilización de la IgG purificada en columnas de intercambio iónico, cuya pureza fue demostrada mediante inmunolectroforesis en agar, haciéndose evidente la existencia de una sola fracción correspondiente a la IgG (Figuras 3 y 4). Esta fracción así purificada fue utilizada en concentraciones óptimas para el recubrimiento de los platos y para la conjugación con la enzima, optimizándose así la técnica para la detección del antígeno. Otro aspecto crítico fue la eliminación de las reacciones inespecíficas presentadas por los extractos de insectos. El uso de PBSAT 0.5 en la preparación de los insectos y en las diluciones del conjugado redujo la inespecificidad a valores insignificantes. La presencia de un detergente no iónico como el Tween 20 previene la formación de interacciones hidrofóbicas adicionales entre proteínas y la fase sólida, no interviniendo en la reacción antígeno-anticuerpo. Sin embargo, para reducir la inespecificidad a niveles aceptables fue necesario agregar un 4% de albúmina además del Tween 20. Su efecto fue el de recubrir o bloquear grupos inespecíficos, lo cual se demuestra en los Cuadros 2 y 3. Por otro lado, se seleccionaron tiempos de incubación de 2 h para el conjugado y para el sustrato, ya que así se duplicaba la sensibilidad del método para la detección del antígeno, sin aumentar significativamente las reacciones inespecíficas (Cuadro 5).

La metodología aquí descrita permitió efectuar estudios detallados del ciclo biológico del VRF en *D. maidis*. Los resultados de estos estudios serán publicados por aparte.

Resumen

Se desarrolló un sistema de inmunosorbencia con ligados enzimáticos (ELISA) para la detección del virus del rayado fino de maíz (VRF) en su insecto vector *Dalbulus maidis*. La optimización del método

incluyó la purificación de la IgG anti-VRF por cromatografía de intercambio iónico y la determinación de concentraciones críticas del conjugado enzima-IgG del detergente Tween 20 y la albúmina bovina. Bajo las condiciones experimentales descritas en este trabajo, la prueba permitió la detección del antígeno viral en insectos individuales a concentraciones menores de 1 ng.

Literatura citada

1. ARQUEMBOURG, P. Immunoelectrophoresis. Theory, Methods, Identification, Interpretation. S. Krager: Basel. 104 p. 1975.
2. BRADFUTE, O. E., NAULT, L. R., GORDON, D. T., ROBERTSON, D. C., FOLER, R. W., BOOTHROYD, C. W. Identification of maize rayado fino virus in the United States. Plant Disease 64:50-53. 1980.
3. CLARK, M. F. Immunosorbent assays in plant pathology. Annual Review of Phytopathology 19:83-106. 1981.
4. FUDENBERG, H. Purification of antibody. In Methods in Immunology and Immunochimistry (Eds. C. A. Williams & M. W. Chase) Vol. I, pp. 307-85. New York: Academic Press. 1967.
5. GAMEZ, R. A. new leafhopper-borne virus of corn in Central America. Plant Disease Reporter 56:929-932. 1969.
6. GAMEZ, R. Transmission of rayado fino virus of maize (*Zea mays* L.) by *Dalbulus maidis* DeLong & Wolcott. Annals of Applied Biology 73:285-292. 1973.

7. GAMEZ, R. Maize Rayado Fino Virus. CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses No. 220, 4 p. 1980.
8. GAMEZ, R., RIVERA, C. y KITAJIMA, E. W. The biological cycle of maize rayado fino virus in its insect vector *Dalbulus maidis*. In Abstracts, Fifth International Congress of Virology. Strasbourg, France p. 293. 1981.
9. GINGERY, R. E., GORDON, D. T. y NAULT, L. R. Purification and properties of an isolate of maize rayado fino virus from the United States. *Phytopathology* 72:1 313-1 318. 1982.
10. LEON, P. y GAMEZ, R. Some physico-chemical properties of maize rayado fino virus. *Journal of General Virology* 56:67-75. 1981.
11. LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J. FARR, A. L. y RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265. 1951.
12. PETERS, R. L. Reophoresis. In Manual for Hepatitis B Antigen Testing. (Eds. M. Aschavai and R. L. Peters) Saunders: Philadelphia. pp. 99-110. 1973.
13. RIVERA, C., KOZUKA, Y. y GAMEZ, R. Rayado fino virus: detection in salivary glands and evidence of increase in virus titer in the leafhopper vector *Dalbulus maidis*. *Turrialba* 31:78-80. 1981.
14. VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D. E., CLARK, F. M. y ADAMS, A. N. The detection of viruses by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology* 33:165-167. 1976.