



DEPARTAMENTO LABORATORIO
Y ESTACIONES CUARENTENARIAS
AGRÍCOLA Y PECUARIA

INSTRUCTIVO PARA EL DIAGNÓSTICO DE PLUM POX VIRUS MEDIANTE ELISA

	Nombre	Cargo	Firma
Preparación	Marcelo Cabrera Valdes	Encargado Laboratorio	
	Valentina Caro Marchant	Enacargada de Unidad	
Revisión Técnica y Formal	Valentina Caro Marchant	Encargada de Unidad	
Aprobación	Eliana Henríquez Flores	Jefe Subdepartamento Laboratorios y Estación Cuarentenaria Agrícola	
Fecha de entrada en vigencia:	8 de Julio de 2003		
Fecha de vigencia versión	28 de agosto de 2006		

INSTRUCTIVO DE PARA DIAGNÓSTICO DE PLUM POX VIRUS MEDIANTE ELISA

Indice

<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1. Objetivo	3
2. Referencia y Documentos Relacionados	3
3. Actividades	3
4. Registros y Archivos	6
5. Anexos	7

1. Objetivo

El objetivo de este instructivo es establecer la metodología, documentación y registros asociados a las actividades relacionadas con la técnica serológica DASi ELISA para el diagnóstico de Plum Pox Virus en las muestras pertenecientes a la Prospección Anual de plantas madres de carozos de viveros para la detección de Plum Pox Virus (PPV). La técnica será realizada por el Encargado de Unidad (EU), por el Encargado de Prospección (Ep), los Agrónomos (IA) y la Técnico Agrícola (T) de la Unidad de Virología.

2. Referencias y Documentos Relacionados

- Procedimiento de Análisis de Muestras Pertenecientes a la Prospección de Plum Pox Virus (PPV)

3. Actividades

3.1. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1.1. Equipos

- Horno Universal.
- Agitador magnético.
- Fabricador de Hielo.
- Mezclador Vórtex.
- Lector microplacas ELISA.
- Refrigerador.

3.1.2. Materiales y Reactivos

- Set de DASi ELISA (marca REAL).
- Controles Positivos.
- Controles Negativos.
- Microplaca ELISA de poliestireno.

- Micropipetas de 10, 100 y 1000 μ l.
- Pipeta graduada 20 ml.
- Propipeta.
- Cámara Húmeda.
- Piseta plástica 500 ml.
- Puntas plásticas blancas de 10 μ l para micropipeta.
- Puntas plásticas amarillas de 100 μ l para micropipeta.
- Puntas plásticas azules de 1000 μ l para micropipeta.
- Vasos precipitados 10 y 50 ml.
- Microtubos 1,5 y 0,6 ml.
- Tampón Carbonato
- Tampón Conjugado
- Tampón de Lavado
- Tampón Sustrato
- Nitrofenil Fosfato (pNPP).
- Hielo en escama.
- Agua destilada.

3.2. Metodología

1. Diluir las inmunoglobulinas policlonales anti-PPV en Tampón Carbonato a una dilución 1:100, en un matraz.
2. Mezclar en un agitador magnético y adicionar 100 μ l de la dilución de tapizado en cada pocillo.
3. Incubar la placa en una cámara húmeda por 4 horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ o en su defecto a 16 horas a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.
4. Lavar 3 veces la placa con Tampón de Lavado (según lo Indica proveedor kit de Diagnóstico).
5. Preparar la muestra y los controles en buffer de extracción (según lo Indica proveedor kit de Diagnóstico).
6. Colocar 100 μ l de homogeneizado de muestra en duplicado, lo que debe ser registrado en un Mapa ELISA.

7. Colocar controles positivos y negativos, y registrarlos en el Mapa ELISA correspondiente.
8. Incubar la placa en una cámara húmeda toda la noche (16 horas) en el refrigerador ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$)
9. Lavar 3 veces la placa con Tampón de Lavado (según lo Indica proveedor kit de Diagnóstico) El primer lavado debe ser muy minucioso para no dejar restos vegetales dentro de los pocillos.
10. Diluya el anticuerpo monoclonal (5B-IVIA) en Tampón Conjugado (según lo Indica proveedor kit de Diagnóstico) a una dilución de 1:1000 en un matraz y mezclar en un agitador magnético.
11. Coloque 100 μl de la dilución del anticuerpo monoclonal por pocillo.
12. Incubar la placa en una cámara húmeda por 2 horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.
13. Lavar 3 veces la placa con Tampón de Lavado
14. Diluir las inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugadas con Fosfatasa Alcalina en Tampón Conjugado (según lo Indica proveedor kit de Diagnóstico) en un matraz a una dilución de 1:1000 y mezclar en un agitador magnético.
15. Colocar 100 μl de la dilución de las inmunoglobulinas conjugadas cabra anti-ratón por pocillo.
16. Incubar la placa en una cámara húmeda por 2 horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.
17. Lavar 3 veces la placa con Tampón de Lavado
18. Preparar la Solución de Revelado agregando 1 mg de Para-Nitrofenil Fosfato (pNPP) por cada ml de Tampón Sustrato (según lo Indica proveedor kit de Diagnóstico)
19. Colocar 100 μl de Solución de Revelado por pocillo.
20. Incubar la placa por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Cubrir la placa para evitar exponer la placa a la luz directa.

3.2.3. Obtención de Resultados

Producto de la reacción del sustrato (pNPP) con la enzima presente en la inmunoglobulina conjugada se produce un cambio de color de la solución de revelado, adquiriendo un color amarillo en el caso que el "Sandwich" de anticuerpos y antígeno se haya formado. Si por el contrario no se forma el "Sandwich" por la ausencia de la partícula de PPV o antígeno, no se produce el cambio de coloración. La intensidad de este cambio de coloración se puede registrar a través de la lectura de Absorbancia a una determinada longitud de onda, que para el caso de este tipo de sustrato corresponde a 405 nm.

Los resultados se obtienen a través de la lectura de las placas en un equipo Lector de ELISA a 405nm el cual entrega valores de absorbancia, realizar al menos dos lecturas en el mencionado lector durante el transcurso de la incubación de la solución de revelado. Los valores que entrega el lector son directamente proporcionales a la intensidad del color. Los valores de absorbancia obtenidos se adjuntaran al mapa de las muestras correspondientes.

3.2.4. Interpretación de Resultados

Se considera como muestra positiva aquella que obtiene un valor de absorbancia igual o mayor al doble del promedio de los negativos incluidos en la placa (este valor es denominado Cut Off) Las muestras que obtengan un valor de un 20% bajo el Cut Off, serán sometidas a un nuevo análisis por DASI-ELISA. Si en este segundo análisis resultan negativas, ese será su resultado definitivo, pero si resultan positivas serán confirmadas por otra técnica. Las muestras positivas serán confirmadas mediante la técnica IC-RT-PCR.

3.2.5. Control de calidad

El control de calidad se realiza a través de la incorporación a la placa de muestras control tanto positivas como negativas. Las muestras negativas son utilizadas para determinar el valor a partir del cual se consideran como muestras positivas. Las muestras positivas sirven para evaluar si la técnica está detectando la presencia o ausencia de PPV.

4. Registros y Archivo

Nº	Nombre documento	Código	Tiempo mínimo de retención	Forma y lugar de archivo	Responsable
01	Mapa ELISA	va/F-02	1 Año	Sala de Serología va	EU,IA,T

Referencias

Real, 2000.Protocolo REALISA-Plum Pox Virus.