

Contenido del Kit:

- Plato ELISA bañado con anticuerpos específicos al antígeno producido por la roya de la soja, configurado en un marco de 12 tiras de 8 pocillos por tira
- Control Positivo (NOTA: no contiene roya de la soja)
- Conjugado Encimático
- Buffer de Extracción del Tejido Vegetal (concentrado 5x)
- Buffer de Lavado (paquete de sales para dilución en solución)
- Substrato
- Solución "STOP"



Fase inicial de la roya



Fase avanzada de la roya



Prepare el Buffer de Lavado y el Buffer de Extracción

Número de Catálogo AP 107

Propósito del Kit

El kit ELISA detecta la presencia de la roya de la soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*. La prueba es capaz de detectar la presencia del patógeno en los estados iniciales de infección, que van desde lesiones cloróticas (antes de la formación de pústulas) hasta pústulas inmaduras (sin liberar esporas). Durante este estado, a menudo es difícil, por un lado, distinguir entre los síntomas causados por la roya de la soja, y por otro, los síntomas causados por enfermedades de origen bacterial, viral y/o fungoso, e incluso, daños causados por insectos. La prueba puede igualmente utilizarse para confirmar síntomas avanzados de la roya (uredinioesporas y telioesporas) siendo así un complemento para las inspecciones visuales de campo.

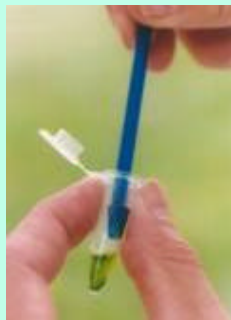
De acuerdo a estudios de inoculación controlada utilizando tan sólo 100,000 esporas/mL, este kit demostró ser capaz de detectar la infección de roya antes de la manifestación de síntomas visuales. Los niveles de infección en el campo pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales.

Materiales Requeridos

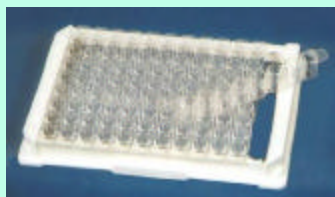
- Kit para extracción del tejido foliar, EnviroLogix Cat. # ACC 002, compuesto de 100 juegos de microtubos tipo Eppendorf y maceradores desechables; alternativamente, se puede utilizar el bolso de muestreo EnviroLogix Cat. # ACC 021 (100 unidades)
- Pipetas capaces de transferir 100 µL
- Marcador indeleble
- Tape o Parafilm®
- Cronómetro
- Agua destilada o desionizada utilizada en la preparación del Buffer de Lavado y para diluir el Buffer de Extracción del Tejido Foliar 5x
- Frascos de vidrio: con capacidad de 250 mL para almacenar 1x Buffer de Extracción; con capacidad de 1 litro para el Buffer de Lavado
- Espectrofotómetro
- Botella de lavado, o lavador de platos / tiras ELISA
- Pipeta tipo "multi-canal" capaz de transferir 100 µL (opcional)
- Tubos de dilución para preparación de muestras previo transferencia simultánea de las mismas al plato ELISA utilizando pipeta multi-canal (opcional)
- Agitador automático de platos ELISA (opcional)



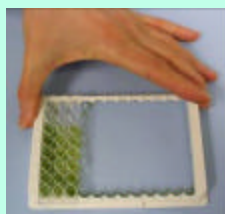
Corte un disco de la hoja como muestra



Use el macerador desechable para triturar el tejido foliar



Saque las tiras ELISA que no sean requeridas



Agregue los extractos de cada muestra



Método de lavado con botella

Preparación de las Soluciones

Buffer de Lavado

Agregue el contenido del paquete de Buffer de Lavado (solución salina buferada, pH 7.4 - Tween 20) a 1 litro de agua destilada o desionizada, y mezcle para diluirlo. Cuando no esté en uso, almacene la solución bajo refrigeración; deje que la solución llegue a temperatura ambiente previo uso.

Buffer de Extracción del Tejido Foliar

Vacíe el contenido completo (50 mL) de la botella de Buffer de Extracción en un frasco de vidrio con capacidad mínima de 250 mL; agregue 200 mL de agua destilada o desionizada. Mezcle la solución rigurosamente para disolverla. Cuando no esté en uso, almacene la solución bajo refrigeración; deje que la solución llegue a temperatura ambiente previo uso. Contáctese EnviroLogix si se requiere Buffer adicional.

Preparación de Muestras

Seleccione una muestra de tejido foliar de una hoja que esté verde (fresco) y presenta un área o mancha sospechosa.

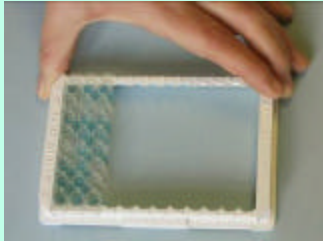
Método de Extracción con el Microtubo de Muestreo: La tapa del microtubo de muestreo permite cortar una muestra de tejido foliar de aproximadamente 10mm en diámetro pesando alrededor de 10-20 miligramos. Tome la muestra colocando el área sospechosa de la hoja encima del microtubo de muestreo, luego cerrando la tapa del mismo contra la hoja para así recortar un disco de tejido foliar que incluye la zona sospechosa. Utilizando un macerador desechable, empuje el disco hasta el fondo del microtubo de muestreo y macérela. Agregue 500 µl del Buffer de Extracción y continúe el proceso de macerado por unos 20-30 segundos o hasta que el tejido foliar se vea bien disuelto. Ejecute este paso cuidadosamente para evitar contaminación cruzada entre muestras, ya sea por tejido vegetal o por solución macerada.

Método de Extracción con la Bolsa de Muestreo: En caso de utilizar la Bolsa de Muestreo, la relación entre el peso del tejido foliar y el volumen de Buffer de Extracción debe estar entre 1:25 y 1:50 (o sea 25-50 mL de Buffer de Extracción por cada gramo de tejido). Con este método el pedazo de hoja a muestrear puede medir aproximadamente 2.5 cm de diámetro (el tamaño de un "quarter") en cuyo caso pesará entre 50 y 120 miligramos. Respetando la relación peso:volumen antes mencionada, en ese caso se agregaría 3 mL de Buffer. Si se elige este método de extracción, asegúrese que la muestra no tiene un exceso de tejido foliar no-afectado o no-sospechoso, ya que eso puede reducir la sensibilidad del ensayo.

Las bolsas de muestreo contienen una malla. Colóque la muestra entre la malla de la bolsa de muestreo. Una vez dentro, apoye la bolsa contra cualquier superficie de trabajo firme y fróte su exterior con un objeto duro (una moneda) hasta que el tejido foliar esté macerado y se vea transparente. Luego vierta el Buffer de Extracción dentro de la bolsa. Mezcle el buffer y la hoja triturada. Haga esto masajando el exterior de la bolsa con los dedos, mientras se mantiene la bolsa cerrada para evitar que se desborde el líquido.



Incubación



La prueba puede leerse a simple vista, o...



...se puede completar el protocolo agregando la solución STOP



y leer el ELISA en un espectrofotómetro dentro de los 30 minutos contando a partir del momento en que se agrega la solución STOP

Como Correr la Prueba

- Lea todas las instrucciones antes de realizar las pruebas con este kit.
 - Permita que el plato ELISA y todos los reactivos refrigerados lleguen a temperatura ambiente dentro del lugar de trabajo antes de comenzar el procedimiento. El plazo prudente para que se ambienten los componentes es 30 minutos. No retire el plato ELISA de su empaque disecante (el bolso “foil”) hasta que el plato haya llegado a temperatura ambiente.
 - Organice todos los reactivos, muestras y pipetas por adelantado para que el primer paso pueda llevarse a cabo en 15 minutos o menos. Si se piensa correr mas de 3 tiras del plato ELISA a la vez, es probable que el tiempo requerido para cargar los pocillos tarde mas de 15 minutos. Para evitar eso, en esa situación es fuertemente recomendado utilizar una pipeta tipo “multi-canal” en los pasos 1, 5, 8 y 9.
 - Si se piensa correr 3 tiras o menos del plato ELISA, utilice una pipeta de puntas desechables para agregar los calibradores y muestras a los pocillos. El Conjugado Encimático, Substrato y Solución STOP pueden agregarse de la misma manera. Como alternativa, tambien se puede utilizar una pipeta “repetidora” con puntas desechables para agregar esos 3 reactivos.
 - Una vez que todos los componentes hayan llegado a temperatura ambiente, saque el plato ELISA de su empaque disecante (bolso “foil”). Si no se piensa utilizar las 12 tiras del plato ELISA, reempaque las tiras no-utilizadas dentro del bolso “foil” y vuelva a refrigerarlas.
 - Cuando esté agregando las muestras y los reactivos en los pocillos, use las marcas identificadoras ubicadas al borde del plato ELISA como guía. Con cada prueba se recomienda dedicar por lo menos un pocillo como control negativo (con una muestra de soja que esté sana) y otro pocillo como “Blank” (sólo con el Buffer de Extracción). A discreción del usuario, se puede dedicar pocillos adicionales a fines de control de calidad. El kit proporciona un Control Positivo para enseñar como luce un resultado positivo fuerte; *el Control Positivo no contiene roya de la soja*. Las muestras en sí pueden correrse singularmente o en pocillos duplicados.
1. Agregue 100 µL de Buffer de Extracción al pocillo reservado para el “Blank”; agregue 100 µL del Control Positivo al pocillo reservado para ese fin; agregue 100 µL de control negativo (preparado por el usuario) a su respectivo pocillo; agregue 100 µL de cada muestra a sus respectivos pocillos. Siga el mismo orden cuando se agreguen los reactivos.
NOTA: Se recomienda fuertemente utilizar una pipeta de tipo “multi-canal” en los pasos 1, 5, 8 and 9.
 2. Mezcle el contenido de los pocillos rigurosamente; esto se suele hacer moviendo el plato ELISA sobre el mesón de trabajo, de manera rápida y circular, por 20-30 segundos. Haga mucho cuidado en este paso para evitar que el contenido de los pocillos se desborde.
 3. Cubra los pocillos con “tape” o “Parafilm” para evitar evaporación e incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. Si se dispone de un agitador automático, agite el plato a 200 rpm.
 4. Después de incubación, retire el “tape” o “Parafilm” cuidadosamente.



Luego vacíe todo el contenido de los pocillos en un fregadero u otro recipiente apropiado. Luego llene todos los pocillos completamente con Buffer de Lavado y vuelva a vaciarlos. Repita este paso de lavado tres veces.

5. Agregue 100 μ L del Conjugado Encimático a cada pocillo.
6. Mezcle el contenido de los pocillos rigurosamente con el mismo procedimiento descrito en el segundo paso. Recubra los pocillos con nuevo “tape” o “Parafilm” e incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Utilice un agitador automático si se dispone del mismo.
7. Lave los pocillos nuevamente según descrito en el cuarto paso. Como alternativa, se puede ejecutar cuatro lavados con un lavador automático de platos ELISA, utilizando para ello 300 μ L de Buffer de Lavado por cada pocillo. Luego pegue el plato ELISA contra una toalla de papel (suavemente) para sacar la mayor cantidad de Buffer de Lavado posible.
8. Agregue 100 μ L del Substrato a cada pocillo. Mezcle el contenido de los pocillos rigurosamente con el mismo procedimiento descrito en el segundo paso. Recubra los pocillos con nuevo “tape” o “Parafilm” e incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Utilice un agitador automático si se dispone del mismo.

NOTA: En este punto del procedimiento los resultados pueden leerse a simple vista. Los pocillos que se ven azulados son positivos para roya de la soja. Resultados ligeramente positivos (o sea, pocillos que presentan azules muy claros) pueden requerir el uso de un espectrofotómetro para su confirmación. Si se piensa utilizar un espectrofotómetro, continúe con el paso 9.

Precaución: La Solución STOP contiene **ácido hidroclicóric** 1N. Manéjela con cuidado.

9. Agregue 100 μ L de la Solución STOP a cada pocillo y mezcle rigurosamente. Esto causará que todos los pocillos positivos se conviertan en amarillo.

NOTA: Se debe leer el plato ELISA en el espectrofotómetro dentro de los 30 minutos contados a partir del momento en que se agregó la Solución STOP.

Como Interpretar los Resultados

Inspección Visual

Después del octavo paso antes mencionado, el pocillo que contiene el Control Positivo debe presentar un color azul fácilmente distinguible. El caso contrario puede ser indicativo de una prueba inválida, posiblemente debido a la ejecución equivocada del protocolo, y por ende la prueba deberá repetirse.

Después del octavo paso antes mencionado, si los pocillos correspondientes a las muestras están azules, los mismos deben interpretarse como resultados positivos para *Phakopsora pachyrhizi*. Resultados positivos ligeros (azules claros) pueden requerir del uso de un espectrofotómetro para fines de confirmación.

Medición espectrofotométrica

La longitud de onda del espectrofotómetro debe estar calibrada en 450 nanómetros (nm). Si el espectrofotómetro tiene capacidad para doble calibración, utilice 600 nm, 630 nm o 650 nm como longitud de onda de referencia.

Interpretación de Resultados

Para determinar la presencia o ausencia de la roya en sus muestras, compare la Densidad Óptica (DO) que corresponde a sus muestras, por una parte, con la Densidad Óptica que corresponde a los pocillos “Blank” y de control negativo, por otra parte. Aquellas muestras cuyos pocillos presentan Densidades Ópticas significativamente superiores a la DO del pocillo Blank y/o del control negativo, deben considerarse como positivas para la roya de la soja.

Reacciones Cruzadas

El kit no reacciona con otras royas causadas por *Uromyces*, *Puccinia* y *Melampsora*. Reacciones cruzadas tampoco han sido observadas con otros hongos tales como *Aspergillus*, *Cercospora kikuchii* o *C. sojina*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Peronospora manchurica*, *Septoria*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, o con bacterias tales *Pseudomonas savastanoi pv. Glycinea*, y *Xanthomonas campestris pv. Glycinea*. Tampoco se han observado reacciones cruzadas con enfermedades en el campo que presentan síntomas parecidos a la roya, entre estas, Mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*); *Cercospora* (*Cercospora kikuchii*); *Septoria* (*Septoria glycines*); Mildeo (*Peronospora manshurica*); Pustula bacteriana (*Xanthomonas campestris pv. Glycinea*); Tizón bacteriano (*Pseudomonas savastanoi pv. Glycinea*)

Precauciones y Notas

- Cuando se vaya a desechar muestras y reactivos, observe todas las reglamentaciones que sean aplicables, lineamientos federales y/o estatales, y protocolos internos de seguridad aplicables a operaciones de laboratorio.
- Cuando este kit QualiPlate no esté en uso, almacene todos sus componentes bajo refrigeración entre 4°C y 8°C (39°F - 46°F).
- Jamás exponga los componentes de este kit QualiPlate a temperaturas superiores a 37°C (99°F) o menores que 2°C (36°F).
- Antes de usarlo, permita que el QualiPlate y todos sus reactivos alcancen temperatura ambiente (18°C - 27°C o 64°F - 81°F).
- No use este kit QualiPlate, ni ninguno de sus componentes, después de su fecha de vencimiento.
- Jamás utilice reactivos o platos ELISA provenientes de un kit QualiPlate con los reactivos o platos ELISA provenientes de otro kit QualiPlate.
- No exponga el Substrato a la luz directa del sol durante el período de incubación, ni tampoco cuando se esté efectuando la transferencia del Substrato con la pipeta.
- No diluya o adultere los reactivos, ni use muestras que no estén contempladas por este protocolo.
- Según se acostumbra con todas pruebas, es recomendable que los resultados sean confirmados por un método alternativo cuando sea necesario.



Para Soporte Técnico
Contáctenos en:

EnviroLogix
500 Riverside Industrial
Parkway
Portland, ME 04103-1486
USA

Tel: (207) 797-0300

Fax: (207) 797-7533

e-mail:

info@envirologix.com

Página web:

www.envirologix.com



GARANTIA LIMITADA

EnviroLogix Inc. (“EnviroLogix”) garantiza los productos vendidos conjuntamente con este instructivo (“los Productos”) contra defectos en los materiales y en cuanto a la calidad de mano de obra cuando estén utilizados antes de la fecha de vencimiento indicada en su empaque y de acuerdo a las instrucciones aplicables. En el caso de que los Productos no estén conformes a esta Garantía Limitada y el cliente notifica EnviroLogix por escrito de dichos defectos durante el plazo de la garantía, incluyendo una oferta por el cliente de devolver los Productos a EnviroLogix para su evaluación, EnviroLogix a su opción reparará o reemplazará cualquier producto o parte del mismo que demuestra tener defectos en los materiales o en la calidad de mano de obra dentro del plazo de la garantía.

ENVIROLOGIX OTORGA NINGUNA OTRA GARANTIA, SEA EXPLICITA O IMPLICITA, INCLUYENDO SIN LIMITACION CUALESQUIERA GARANTIAS IMPLICITAS DE INDOLE COMERCIAL O DE USO.

La garantía otorgada mediante este instrumento y los datos, especificaciones y descripciones de los productos de EnviroLogix que aparecen publicados en sus catálogos y demás literatura oficial son las únicas representaciones realizadas con respecto a los Productos y la Garantía. Con la salvedad de declaraciones escritas firmadas por un funcionario debidamente autorizado por EnviroLogix Inc., ningunas otras declaraciones o representaciones, escritas u orales, realizadas por empleados, agentes o representantes de EnviroLogix son válidas, no constituyen parte de la garantía otorgada mediante este instrumento, no constituyen una parte del convenio de compra-venta y no deben considerarse fiables.

EnviroLogix no garantiza contra daños o defectos causados por el mal manejo, transporte, accidentes o el uso indebido o anormal de los Productos, contra defectos en productos o componentes no fabricados por EnviroLogix, ni contra daños causados por dichos componentes no fabricados por EnviroLogix. EnviroLogix le cede al cliente la garantía recibida (si existe) del fabricante de dichos productos o componentes. Esta garantía tampoco aplica a los Productos que hayan sufrido cambios o modificaciones realizadas o intentadas por personas que no estuviesen expresamente autorizadas por EnviroLogix.

ESTA GARANTIA ES EXCLUSIVA. La única y exclusiva obligación de EnviroLogix será de reparar o reemplazar los productos defectivos en la manera y el plazo antes mencionado. Con respecto a los Productos o cualquier parte de los mismos EnviroLogix no asume ni asumirá ninguna otra obligación, independientemente de que sea derivada del mismo convenio de compra-venta, agravio (“tort”), responsabilidad estricta (“strict liability”) o cualquier otra base.

Bajo ninguna circunstancia EnviroLogix se responsabilizará por daños consecuentes, especiales o incidentales independientemente de que sean basados en esta Garantía Limitada o no.

Esta Garantía Limitada expresa la totalidad de la obligación de EnviroLogix con respecto a los Productos. Si se determina que cualquier parte de esta Garantía Limitada es inaplicable o ilegal, el resto de la misma permanecerá en plena vigencia.

*Parafilm es una marca registrada del American Can Corporation
EnviroLogix, el logo de EnviroLogix y QualiPlate son marcas registradas de
EnviroLogix Inc.*

© EnviroLogix 2006