



TOETSLABORATORIUMS

(Soos gewysig op 05 Junie 2025)

INHOUDSOPGAWE

1.	REGISTRASIE VAN TOETSLABORATORIUMS	2
2.	DIAGNOSTIESE TOETSAPPARATE BENODIG	3
3.	PLANTVERBETERINGSVEREISTES TEN OPSIGTE VAN VIRUSUITSKAKELING	4
4.	ELISA ONDERSOEKE	4
5.	PKR	6

1. REGISTRASIE VAN TOETSLABORATORIUMS

- 1.1 Toetslaboratoriums moet by die Departement van Landbou (NDL) as 'n besigheid vir die bedryf van 'n laboratorium geregistreer wees en moet voldoen aan die vereistes wat ingevolge die Plantverbeteringswet voorgeskryf word alvorens 'n laboratorium by die WVV geregistreer kan word.
- 1.2 Elke PVO moet die WVV in kennis stel van watter laboratoriums gebruik word om toetse uit te voer ten opsigte van elke patoëen, insek of virus soos voorgeskryf in die Skema.
- 1.3 Indien 'n laboratorium nie reeds ten opsigte van 'n spesifieke patoëen, insek of virus by die WVV geregistreer is nie, moet die betrokke PVO daarvoor aansoek doen.
- 1.4 Laboratoriums waarvoor aansoek gedoen word moet aan die hand van die vereistes soos uiteengesit in Afdeling 2 deur die aangewese paneel beoordeel word, wat hul verslag aan die Tegniese Komitee en Raad moet voorlê vir goedkeuring.
- 1.5 Toetse in terme van die Skema kan slegs namens 'n PVO uitgevoer word deur laboratoriums wat ten opsigte van die spesifieke toets by die WVV geregistreer is.
- 1.6 Laboratoriums word by die Raad geregistreer op grond van die toerusting en die bevoegdheid van die personeel wat die toetse op daardie stadium uitvoer. Enige verandering of uitbreiding ten opsigte van apparaat en kundigheid van personeel moet by die Raad aangemeld word.
- 1.7 Geregistreerde laboratoriums moet oor die nodige gedokumenteerde literatuur en verwysings beskik ten einde die verskillende swamme en bakterieë te kan identifiseer.
- 1.8 Geregistreerde laboratoriums moet oor die voorskrifte van die goedgekeurde ELISA en PKR verskaffers beskik ten opsigte van die virus siektes waarvoor getoets word.
- 1.9 Alle apparate moet as deel van die laboratorium praktyke in 'n goeie toestand gehou word en diensrekords moet beskikbaar wees dat chemiese weegskale en ander apparate op 'n gereelde basis geyk word.
- 1.10 Alle geregistreerde laboratoriums moet in elke gelyke jaartal gedurende Oktober deur NDL geoudit word ten opsigte van die ELISA toets vir Netelblaar en elke ongelyke jaartal gedurende April geoudit word ten opsigte van die ELISA toets vir Rolblaar.

2. DIAGNOSTIESE TOETSE - APPARATE BENODIG

2.1. Virusse (ELISA toetse)

- Elektroniese ELISA-plaatleser (405 nm)
- pH meter
- Weegskaal (0-300g; 2 desimaal)
- Inkubator (37°C)

2.2. Swamme

- Laminêre vloekabinet
- Outoklaaf
- Weegskaal (0-300g; 2 desimaal)
- pH meter
- Groeikamer of inkubator vir isolasies (23 – 25°C)
- Stereomikroskoop (40X)
- Ligmikroskoop (1000X)
- Nuutste gepubliseerde ID sleutels vir betrokke organisme moet gedokumenteer wees in betrokke laboratorium.

2.3. Bakterieë

- Laminêre vloekabinet
- Outoklaaf
- Weegskaal (0-300g; 2 desimaal)
- pH meter
- Groeikamer of inkubator vir isolasies (23 – 25°C)
- Ligmikroskoop (100X)
- Nuutste gepubliseerde ID sleutels vir betrokke organisme moet gedokumenteer wees in betrokke laboratorium.

2.4 Aalwurms

- Siwwe:
 - Stapel van drie vlekvrige staal of koper siwwe
 - 4mm siwwe
 - 90µm polyethylene-ondersteunende siwwe
- Stereomikroskoop(16X, 25X)
- Lig Mikroskoop met 'n natrek buis (10X, 100X & 10X oogstuk)
- Temperatuur beheerde oond (40°C)
- Dessikator
- Verwysingskyfies vir eksemplare.

2.5 Insekte

- Stereomikroskoop (40X)
- Nuutste gepubliseerde ID sleutels vir betrokke organisme moet gedokumenteer wees in betrokke laboratorium.

3. VIRUS UITSKAKELING - BENODIGDHEDE

3.1 Hitteterapie en Weefselkultuur

- Hitteterapie-eenheid (40°C)
- Laminêre vloekabinet
- Outoklaaf
- Weegskaal (0-300g; 2 desimaal)
- pH meter
- Groekamer of inkubator (23 – 25°C)
- Stereomikroskoop (40X)

3.2 Somatiese Embriogenese en Weefselkultuur

- Laminêre vloekabinet
- Outoklaaf
- Weegskaal (0-300g; 2 desimaal)
- pH meter
- Groekamer of inkubator (23 – 25°C)

3.3 Kweekhuis

- Moet voldoen aan vereistes soos vir Kerneenheid ingevolge die skema

4. ELISA ONDERSOEKE

4.1 Inleiding

ELISA is 'n akroniem vir “Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay”. Dit is die mees algemene serologiese toets wat gebruik word vir die opsporing van plantvirsse.

Daar is twee tipes ELISA toetse wat algemeen gebruik word:

- a) DAS ELISA ('Double Antibody Sandwich'); en
- b) Indirekte ELISA toets

4.2 DAS-ELISA metode

Die metode word vir die opsporing van meeste plantvirsusse gebruik en kan soos volg opgesom word:

- a) Suiwer IgG teen 'n spesifieke virus word op die oppervlak van die ELISA plaat vasgevang;
- b) Homoloë viruspartikels word deur die IgG verbind terwyl nie-spesifieke partikels weggespoel word;
- c) E-IgG (ensiemkonjugaat) word bygevoeg en bind aan die vasgevangene viruspartikels. Oormatige E-IgG word weggespoel;
- d) 'n Ensiemsubstraat word bygevoeg om die vasgebinde E-IgG op te spoor en vorm 'n geelkleur reaksie.

4.3 Indirekte ELISA metode

Die Indirekte ELISA metode verskil nie baie van die DAS-ELISA metode nie, behalwe dat twee antiliggaam inkubasies volg na toevoeging van die plantsap:

- a) Virus antiliggaam A word by plaat gevoeg en bind aan oppervlak;
- b) Plantsap word bygevoeg;
- c) Byvoeging van virus antiliggaam B;
- d) Anti-B globulien word bygevoeg ('goat anti-rabbit IgG');
- e) Byvoeging van ensiemsubstraat.

4.4 ELISA protokol

4.4.1 Aangesien daar verskillende verskaffers van die toetsstelle is kan daar nie 'n standaard ELISA protokol voorgeskryf word nie. Gevolglik moet die voorskrifte wat saam met die toetsstel deur die betrokke verskaffer voorsien word streng nagevolg word.

4.4.2 In gevalle waar die plaatjies en reagense volgens die voorskrifte van die verskaffer vooraf verwarm is, kan slegs een herhaling van die monsters getoets word.

4.4.3 In gevalle waar die plaatjies en reagense nie vooraf verwarm is nie, moet alle monsters in duplikaat getoets word.

4.5 Beskikbare ELISA toetse vir nie-kwarantyn virusse wat wingerd infekteer

Virus naam	Afkorting	ELISA Protokol gebruik	Verskaffer
<i>Grapevine Fanleaf Virus</i>	GFLV	DAS ELISA	Agritest, Agdia, Bioreba, Sediag, Plant SA - Gratis
Grapevine Fleck Virus	GFkV	DAS ELISA	Agritest, Bioreba, Creative Diagnostics
Grapevine Leaf Roll assoc.Virus 1*	GLRaV 1	DAS ELISA	Agritest, ARC-PHP, Bioreba, Sediag
Grapevine Leaf Roll assoc.Virus 2	GLRaV 2	DAS ELISA Indirekte ELISA	Agritest, ARC-PHP, Bioreba, Sediag
Grapevine Leaf Roll assoc.Virus 3*	GLRaV 3	DAS ELISA	Agritest, ARC-PHP, Bioreba, Patho Solutions
Grapevine Leaf Roll assoc.Virus 1 and 3	GLRaV 1&3	DAS ELISA	Patho Solutions
Grapevine Leaf Roll assoc.Virus 4	GLRaV 4	DAS ELISA	Bioreba
Grapevine Leaf Roll assoc.Virus 5	GLRaV 5	DAS ELISA	Bioreba, Sanofi, Agdia, Bio-Rad, Sediag
Grapevine Leaf Roll assoc.Virus 6	GLRaV 6	DAS ELISA	Bioreba
Grapevine Leaf Roll assoc.Virus 7	GLRaV 7	DAS ELISA	Agritest, Agdia, Bioreba, Sediag
Grapevine Leaf Roll assoc.Virus 9	GLRaV 9	DAS ELISA	Geen
Grapevine Virus A	GVA	DAS ELISA	Agritest, Bioreba, Sediag
Grapevine Virus B	GVB	DAS ELISA	Agritest, Sediag

* 'n Indirekte ELISA toets vir die gelyktydige opsporing van GLRaV1 en GLRaV3 in wingerd is beskikbaar. Die toets is opgestel deur die Patho Solutions.

5. PKR ONDERSOEKE

5.1 Inleiding

Die polimerasekettingreaksie (PKR) is 'n metode vir die amplifisering van DNS met die hulp van 'n DNS polimerase ensiem en DNS inleiers. Geskikte inleiers sal voorgestel en jaarliks hersien word deur die tegniese komitee. Die proses word algemeen gebruik as 'n diagnostiese toets om die teenwoordigheid van patogeen-nukleinsure te bepaal. Vir organismes met DNS genome word PKR direk gebruik, maar vir virusse met RNS genome moet die RNS vanaf 'n monster eers omgeskakel word na DNS deur middel van 'n tru-transkripsie reaksie, na die metode word verwys as TT-PKR of "*Reverse-transcription PCR*" (RT-PCR).

5.2 TT-PKR

Die metode word vir die opsporing van meeste plantvirsse gebruik en kan soos volg opgesom word:

- a) Toepaslike plantmonsters word geneem waaruit RNS gesuiwer word. Verskeie metodes is beskikbaar vir die stap en kan deur die diensverskaffer bepaal word.
- b) RNS word aan kwaliteitsbeheer blootgestel en hoë kwaliteit RNS word gebruik vir die diagnostiese toets.
- c) Inleiers word ontwerp wat aan spesifieke virusse of virusgroepe se genome kan bind. Die afstand (in basispare) tussen inleiers bepaal die grootte van die amplifikasie produk (amplikon).
- d) RNS word in 'n TT reaksie omgeskakel in komplementêre- of kopie-DNS (kDNS).
- e) Die kDNS word dan met behulp van inleiers in 'n PKR vermeeder indien die virus in die monster teenwoordig is.
- f) Die produk van 'n positiewe TT-PKR kan op twee maniere bepaal word:
 - i. Die vermeerderde DNS kan op 'n agarose gel onder elektriese stroom geskei word en vertoon dan as 'n band op die gel waarvan die grootte bepaal kan word, as dit gekleur (EtBr) en aan UV lig blootgestel word;
 - ii. Die TT-PKR kan ook in 'n In-tyd PKR-masjien opgestel word waar die vermeerdering van DNS in-tyd, op 'n rekenaar, gemonitor word.