

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)

PNT/CISA/PPA/ELISA/2/2008

(PROCEDIMIENTO ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE BLOQUEO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA)

Rev. 1

Fecha de entrada en vigor: Diciembre 2008

REV.	FECHA	EPÍGRAFE/S	CAUSA DEL CAMBIO
<u>Realizado</u> Fdo.: Carmina Gallardo Frontaura Responsable técnico del Laboratorio Nacional y Comunitario de PPA Fecha:		<u>Revisado</u> Fdo.: Miguel Ángel Jiménez Clavero Jefe de Servicio de Coordinación P3 Fecha:	<u>Aprobado</u> Fdo.: Marisa Arias Neira Directora Técnica del CISA Fecha:

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE BLOQUEO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/ELISA/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 2 de 8

ÍNDICE	
1.	OBJETO
2.	ALCANCE
3.	REFERENCIAS
3.1.	DOCUMENTOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN
3.2.	DOCUMENTOS A UTILIZAR CONJUNTAMENTE
4.	GENERAL
5.	DESCRIPCIÓN
5.1.	EQUIPOS Y MATERIALES
5.2.	PREPARACIÓN
5.3.	REALIZACIÓN
5.4.	TRATAMIENTO DE RESULTADOS
5.5.	PUNTOS CRÍTICOS
5.6.	MEDIDAS DE SEGURIDAD
5.7.	CONTROL DE CALIDAD
6.	ANEXOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE BLOQUEO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/ELISA/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 3 de 8

1. OBJETO

El presente procedimiento tiene por objeto describir el método para la detección de anticuerpos específicos del Virus de la Peste porcina africana (VPPA) por el método ELISA.

2. ALCANCE

Este procedimiento es de aplicación a muestras de suero porcino.

3. REFERENCIAS

3.1. DOCUMENTOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN

Como referencia básica para la elaboración de este procedimiento se han tomado los criterios establecidos en los siguientes documentos:

1. Protocol INGEZIM PPA COMPAC (1.1.PPA.K3), registered by MAPA nº 335 RD July, 2002/.

4. GENERAL

4.1 Abreviaturas

PPA: Peste porcina africana
VPPA: Virus de la Peste Porcina Africana.
CP: Control positivo.
CN: Control negativo.
DO; Densidad óptica.
CO: Cut off (punto de corte).
IB: Immunoblotting.

4.2 Principio

El kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de bloqueo (ELISA de bloqueo), que se describe brevemente a continuación: Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) se fija el antígeno. Cuando sobre el antígeno se dispensan los sueros a testar junto con un anticuerpo monoclonal (previamente marcado con peroxidasa), específico frente al virus en el caso de que el suero problema contenga anticuerpos frente al virus, estos se unirán a él imposibilitando la unión del monoclonal, mientras que si el suero problema carece de dichos anticuerpos, será el monoclonal el que se una al antígeno fijado en la placa. Tras eliminar todo el material no adherido a la placa mediante sucesivos pasos de lavado, podremos revelar la presencia o ausencia de monoclonal marcado añadiendo el sustrato adecuado, que en presencia de peroxidasa dará lugar a una reacción colorimétrica medible. De esta forma, la presencia de color en el pocillo indicará la ausencia de anticuerpos específicos frente al virus en el suero ensayado y la ausencia de color, la presencia de anticuerpos. El antígeno adsorbido a la placa se trata en este caso de un extracto purificado de la proteína

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE BLOQUEO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/ELISA/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 4 de 8

estructural VP73 del virus de la PPA (proteína estructural mayoritaria del virus y la de mayor poder antigénico).

5. DESCRIPCIÓN

5.1. EQUIPOS Y MATERIALES

COMPOSICIÓN DEL KIT

- Placas de microtitulación de 8x12 pocillos
- Viales de suero Control Positivo inactivado
- Viales de suero Control Negativo
- Viales de Conjugado (100x concentrado)
- Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada
- Frascos de Diluyente (DE01-1) (a la dilución de uso)
- Frascos de Sustrato (TMB) a la dilución de uso.
- Frascos de Solución de Frenado

Mantener todos los componentes a +4°C. Los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible alicuotarlos y congelarlos para posteriores utilizaciones

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT

- Agitador de placas
- Cámara o estufa de 37°C
- Centrifuga de mesa
- Congelador de -20
- Congelador -70
- Cubetas desechables
- Espectrofotómetro UV/VIS de placas con filtro de 450 nm anexo a un programa de computadora para poder registrar e imprimir las lecturas.
- Guantes de látex o de nitrilo
- Micropipeta automática monocanal de 200-1000µl.
- Micropipeta automática monocanal de 10-200µl.
- Micropipeta automática monocanal de 10-100µl.
- Micropipeta automática monocanal de 1-10µl.
- Micropipeta automática multicanal de 50-300µl.
- Micropipeta automática multicanal de 5-50µl.
- Nevera de 4°C
- Papel de aluminio
- Papel adsorbente.
- Pipeteador automático Pipetboy acu o equivalente
- Pipetas de vidrio o plástico, estéril, para descargar 1-10ml.
- Puntas de pipetas desechables

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE BLOQUEO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/ELISA/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 5 de 8

- Tubos eppendorf (o equivalentes) de 0,5ml; 1,5ml y 2ml
- Tubos de plástico estériles de 10 ml y 50 ml.
- Vórtex.
- Agua destilada

5.2. PREPARACIÓN

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- **Solución de lavado:** Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada (p.ej. 40 ml de concentrado +960 ml de H₂O). *Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida a +4°C.*
- **Sueros Control (+) y (-):** Los controles deberán tratarse del mismo modo que las muestras, es decir para su ensayo deberá realizarse la dilución 1/2 en el diluyente suministrado. Esta dilución puede realizarse directamente sobre el pocillo de la placa dispensando 50 µl de diluyente y 50 µl de suero. *Los sueros controles, permanecerán estables durante 1 mes a +4°C. Si se requiere alargar estos periodos, recomendamos distribuirlos en alícuotas y almacenarlos hasta su uso a -20°C.*
- **Preparación del conjugado:** A realizar inmediatamente antes de su utilización. Realizar una dilución 1/100 en diluyente suministrado. Agitar bien antes de su uso. Preparar únicamente el volumen estrictamente necesario para cada prueba, ya que la solución sobrante debe ser desechada.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

MUESTRA: Sangre sin anticoagulante o suero del animal, obtenido por venipunción de vena yugular.

NOTA: Cada muestra debe haber sido previamente ingresada por lo que estará identificada con un número de registro de entrada en el CISA y un número de identificación de la muestra (ID muestra) en caso de que hayan ingresado más de una muestra del mismo remitente.

- Si la muestra viene sin procesar (sangre sin anticoagulante) se incuba primero 1 hora a 37°C y después toda la noche a 4°C para permitir la separación del coágulo sanguíneo.
- Se retira el coágulo y se centrifuga en centrífuga de mesa [Megafuge 1.0R rotor Heraeus #7570] a 780g (1.500 r.p.m) durante 10 minutos.
- El sobrenadante se pasa a un tubo cónico de 1,5ml “tipo eppendorf”, el cual se rotula con el número de registro de entrada en el CISA y la ID de la muestra correspondiente.
- Para su uso en el kit, deberán diluirse ½ en el diluyente proporcionado. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo 50µl de diluyente y 50µl de muestra.

5.3. REALIZACIÓN

1. Antes de iniciar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. **Adición de los sueros;** si se realiza la dilución en el mismo pocillo, añadir en primer lugar 50µl de diluyente y a continuación 50 µl de las muestras y controles. De este modo obtendremos una dilución de los sueros ½. Agitar suavemente para una correcta homogenización de la mezcla, teniendo precaución de que no se produzca trasvase de unos pocillos a otros. Se recomienda ensayar muestras y controles por duplicado. Sellar la placa e incubar 1 hora a 37°C o durante toda la noche (18 horas) a 18-25°C.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE BLOQUEO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/ELISA/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 6 de 8

3. **Lavado de las placas;** lavar 4 veces según procedimiento descrito en el punto 5.5.
4. **Adición del conjugado;** añadir en cada pocillo 100 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores. Sellar la placa e incubar 30 minutos a 37°C.
5. **Lavado de las placas;** lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente.
6. **Adición del sustrato;** añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para mayor rapidez y uniformidad. Mantener la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo siguiendo el mismo orden que se utilizó para dispensar la solución sustrato.
8. **Lectura de la placa;** los resultado se obtienen por lectura calorimétrica en espectrofotómetro UV/VIS de placas a una longitud de onda de 450 nm.

5.4. TRATAMIENTO DE RESULTADOS

NOTA: Al momento de la lectura de resultados, cada placa es analizada de forma individual es decir, se observan los valores de los controles de cada placa, y se calcula el CO y la relación CP/CN de cada una. De esta manera, los sueros serán analizados con respecto a sus controles de placa.

Validación del ensayo

Para que el test se considere válido, ha de cumplirse que el valor de DO media de los pocillos de control negativo sea al menos 4 veces el valor de DO media de los pocillos del suero control positivo:

DO CN	= ≥ 4
DO CP	

Cálculo del punto de corte (Cut Off-CO)

Para proceder a interpretar los resultados obtenidos en ELISA, se realiza primero el cálculo del CO a partir del cual se definirán qué sueros son negativos, dudosos o positivos. Si se están analizando las muestras por duplicado, se tomarán como valor de DO, la media de los valores obtenidos en ambos pocillos. Los puntos de corte positivo y negativo se calculan del siguiente modo:

$$\text{Punto de corte Positivo} = CN - [(CN-CP) \times 0.5]$$

$$\text{Punto de corte Negativo} = CN - [(CN-CP) \times 0.4]$$

Donde: CN = DO Control Negativo
CP = DO Control Positivo

Si se desea calcular el porcentaje de competición (X %) se procederá del siguiente modo:

$$X\% = \frac{CN - DO \text{ muestra}}{CN - CP}$$

Interpretación de resultados

- Las **muestras de suero se considerarán positivas** cuando presenten **valores de DO inferiores** al punto de corte positivo.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE BLOQUEO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/ELISA/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 7 de 8

- Las **muestras de suero se considerarán negativas** cuando presenten **valores de DO superior** al punto de corte negativo.
- Aquellas muestras cuyos valores de absorbancia se sitúen entre ambos puntos de corte, serán consideradas **dudosas**.

Los sueros considerados dudosos se confirman mediante la técnica de IB.

5.5. PUNTOS CRÍTICOS

1. **Los lavados** pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300 µl por pocillo. Tras las incubaciones, realizar los lavados según las siguientes instrucciones:
 - Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de sosa, ya que si bien el antígeno utilizado en el kit es absolutamente inerte, los sueros problema pueden contener agentes infectivos.
 - Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
 - Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
 - Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
 - Repetir el proceso cuantas veces sea indicado. Tras el lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
 - Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.
2. **No usar muestras muy hemolizadas o contaminadas; pueden dar falsos resultados.**

5.6. MEDIDAS DE SEGURIDAD

1. Leer atentamente el protocolo.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
5. No comer, beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
6. No pipetear los reactivos con la boca.
7. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
8. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
9. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Retirar del frasco la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al frasco el sustrato sobrante.
10. La solución de frenado es un ácido. Manipular con precaución.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE BLOQUEO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/ELISA/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 8 de 8

6. ANEXOS

Anexo 1. Plantilla CISA/PPA/ELISA/2/2008

**REGISTRO ENTRADA CISA:
FECHA REALIZACIÓN:
TÉCNICO:
LOTE KIT:**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

RESULTADOS;

**DO MEDIA CP;
DO MEDIA CN;
PUNTO DE CORTE POSITIVO;
PUNTO DE CORTE NEGATIVO;**