

# CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)

**PNT/CISA/PPA/IB/1/2008**

**(PROCEDIMIENTO: IMMUNOBLOTTING OIE  
PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA  
PESTE PORCINA AFRICANA)**

**Rev. 1**

**Fecha de entrada en vigor: Diciembre 2008**

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

<b>CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)</b>	<b>IMMUNOBLOTTING OIE PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA</b>	PNT/CISA/PPA/IB/1/2008
		Rev. 1
		Hoja 2 de 8

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

<b>CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)</b>	IMMUNOBLOTTING OIE PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/IB/1/2008
		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 de Immunoblotting. Este ensayo se usa en el diagnóstico de la Peste porcina africana (PPA) como técnica de confirmación de sueros positivos y dudosos obtenidos en la técnica ELISA.

*Técnica de referencia de la OIE (Capítulo 2.6.6 del Manual de diagnóstico y vacunas de los animales terrestres Edición 2008) como diagnóstico serológico de confirmación de la PPA.*

## 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. Manual de diagnóstico y vacunas de los animales terrestres. Capítulo 2.8.1. OIE, sexta edición, 2008. [[http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A\\_00035.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00035.htm)]
2. Ensayos de comparación interlaboratorial organizados por el Laboratorio Comunitario de Referencia.
3. PG/LCV/001 Procedimiento para la elaboración de documentos, Edición 01.
4. Alcaraz C, De Diego M, Pastor MJ, Escribano JM. (1990). Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus. J Vet Diagn Invest. Jul;2(3):191-6.
5. Arias, M.; Escribano, J.M.; Sánchez-Vizcaíno, J.M.(1993). Persistence of African swine fever antibody reactivity on Elisa and immunoblotting assays. Veterinary Record, 133, 189-190.
6. Escribano JM, Pastor MJ, Sánchez-Vizcaíno JM. (1989). Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false-positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever. Am J Vet Res. Jul;50(7):1118-22.
7. Pastor M. J., Laviada M. D., Sánchez-Vizcaíno J. M. and Escribano J.M. (1989). Detection of African swine fever virus antibodies by Immunoblotting assay. Can. J. Vet. Res. 53, 105-107.

#### **PPA revisiones:**

1. Arias, M.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2002). "African Swine Fever (ASF)". In Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Iowa State University press, ISBN: 0813803837. Eds. A. Morilla, K-J Yoon, J. Zimmerman. Pp 119-124.
2. Arias, M.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2002). "African Swine Fever Eradication: The Spanish model. In Trends in Emerging Viral Infections of Swine". Iowa State University press, ISBN: 0813803837. Eds.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	IMMUNOBLOTTING OIE PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/IB/1/2008
		Rev. 1
		Hoja 4 de 8

- A. Morilla, K-J Yoon, J. Zimmerman. Pp 133-139.
3. Arias, M.; Sánchez, C.; González, M.A.; Carrasco, L. y Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2002). “Peste porcina Africana” In curso digital de enfermedades infecciosas porcinas”. [www.sanidadanimal.info] on line, July, 2002/.

### 3.2. DOCUMENTOS A UTILIZAR CONJUNTAMENTE

- Procedimiento para la obtención del antígeno soluble citoplasmático del VPPA (PNT/CISA/PPA/Ag/1/2008)
- Procedimiento para la obtención de las tiras de nitrocelulosa con el antígeno soluble citoplasmático del VPPA transferido (PNT/CISA/PPA/IB/1/2008)

## 4. GENERAL

### 4.1 Abreviaturas

PPA: Peste porcina africana  
VPPA: Virus de la Peste Porcina Africana.  
Ag: Antígeno soluble citoplasmático del VPPA  
CP: Control positivo de referencia.  
CN: Control negativo de referencia.  
IB: Immunoblotting.

### 4.2 Principio

El Immunoblotting es una técnica inmunoenzimática que utiliza como soporte antigénico filtros de nitrocelulosa, donde las proteínas virales han sido previamente transferidas. Para la obtención de los filtros antigenados las proteínas virales del VPPA se separan electroforéticamente en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a intensidad constante y se transfieren a membranas de nitrocelulosa. La porción de filtro conteniendo las proteínas de interés es cortada en tiras de 3mm de ancho y se bloquean para saturar posibles sitios de unión inespecíficos a las proteínas. Después de bloquear se adicionan los sueros problema para permitir que los anticuerpos presentes reaccionen con el antígeno específico. La reacción se revela utilizando como conjugado proteína A marcada con peroxidasa. Los inmunocomplejos formados que permanecen en la tira de nitrocelulosa se detectan mediante la adición del sustrato insoluble de inmunotransferencia, que en presencia de la peroxidasa y del peróxido de hidrógeno produce un precipitado de un determinado color.

**Proteínas usadas en el diagnóstico del VPPA mediante el IMMUNOBLOTTING;** en estudios experimentales se determinaron las proteínas del VPPA capaces de inducir anticuerpos específicos a partir del día 10 post-infección mediante la técnica del IB. Estas proteínas presentan los siguientes pesos moleculares ( $\times 10^{-3}$ ); IP 23.5, IP 25, IP 25.5, IP 30, IP 31, IP 34 e IP 35.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	IMMUNOBLOTTING OIE PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/IB/1/2008
		Rev. 1
		Hoja 5 de 8

## 5. DESCRIPCIÓN

### 5.1. EQUIPOS Y MATERIALES

#### MATERIALES NECESARIOS.

- Agua destilada
- Agitador de placas
- Balanza electrónica
- Cámara o estufa de 37°C
- Centrífuga de mesa
- Congelador de -20
- Congelador -70
- Cubetas desechables
- Guantes de látex o de nitrilo
- Micropipetas automática monocanal de 1-10µl.
- Micropipetas automática monocanal de 10-100µl.
- Micropipetas automática monocanal de 10-200µl.
- Micropipetas automática monocanal de 200-1000µl.
- Nevera de 4°C
- Papel de aluminio
- Papel adsorbente.
- pH metro
- Pipeteador automático Pipetboy acu o equivalente
- Pipetas de vidrio o plástico, estéril, para descargar 1-10ml.
- Puntas de pipetas desechables
- Reloj cronómetro
- Tubos eppendorf (o equivalentes) de 0,5ml; 1,5ml y 2ml
- Tubos de plástico estériles de 10 ml y 50 ml.
- Vórtex.

#### REACTIVOS NECESARIOS.

- **Tiras de IB;** tiras de IB producidas y suministradas por el CISA-INIA  
*Conservación; temperatura ambiente (fecha de caducidad 12 meses)*
- **CP:** Control positivo de referencia producido y suministrado por el CISA-INIA en viales liofilizados de 0,5ml, 1ml o 2ml.  
*Conservación; 4°C liofilizado. Una vez resuspendido alicuotar y conservar a -20°C (fecha de caducidad 18 meses)*
- **CN:** Control negativo de referencia producido y suministrado por el CISA-INIA en viales liofilizados de 0,5ml, 1ml o 2ml.  
*Conservación; 4°C liofilizado. Una vez resuspendido alicuotar y conservar a -20°C (fecha de caducidad 18 meses)*
- **Conjugado:** proteína A marcada con peroxidasa 1mg/ml (PIERCE, REF. 0032400)  
*Conservación; 4°C liofilizado. Una vez resuspendido alicuotar y conservar a -20°C (fecha de caducidad indicada en el vial)*

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	IMMUNOBLOTTING OIE PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/IB/1/2008
		Rev. 1
		Hoja 6 de 8

- **Tampón fosfato salino (PBS)/Tween-20, pH 7,2**

ClNa	-----	8,0 g
ClK	-----	0,2 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	-----	0,2 g
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	-----	1,15 g
Tween-20	-----	0,5 ml
H <sub>2</sub> O destilada	-----	1000 ml

*Conservación; temperatura ambiente*

- **Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2**

ClNa	-----	8,0 g
ClK	-----	0,2 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	-----	0,2 g
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	-----	1,15 g
H <sub>2</sub> O destilada	-----	1000 ml

*Conservación; temperatura ambiente*

- **Solución bloqueo:** PBS/Tween-20, pH 7,2/2% Leche; 20 gr de leche en polvo (NESTLÉ- Sveltesse o Molico) en 1L de agua destilada

*Conservación; en alícuotas a -20°C*

- **Solución sustrato:** : Metanol [MERCCK Ref.1.06009], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% [Panreac Ref. 141077] and 4-chloronaphtol 2.5 gr [SIGMA. Ref. C-8890].

*Conservación; temperatura ambiente*

## 5.2. PREPARACIÓN

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- **Preparación de los controles (CP y CN);** resuspender los controles en agua destilada en la cantidad indicada en el vial. Una vez resuspendido alicuotar según las necesidades de uso y conservar a -20°C hasta el momento de su utilización. Antes de añadir a la tira de IB realizar una dilución 1/40 en PBS 1x/0,05% Tween-20/2% Leche
- **Preparación del conjugado;** Resuspender en 200 µl de agua destilada. Una vez resuspendidos alicuotar según las necesidades de uso y conservar a -20°. Antes de añadir a las tiras de IB realizar una dilución 1/1000 en PBS 1x/0,05% Tween-20/2% Leche
- **Preparación de la solución sustrato;** a realizar inmediatamente antes de su utilización.
  - a) Disolver 6 mg de 4-chloronaphtol en 2 ml de Metanol
  - b) Adicional la solución de 4-chloronaphtol/Metanol a 10 ml de PBS buffer pH 7.2, en agitación constante.
  - c) Adicionar 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% a la solución de PBS/4-chloronaphtol.

### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

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

<b>CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)</b>	IMMUNOBLOTTING OIE PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/IB/1/2008
		Rev. 1
		Hoja 7 de 8

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.

En el caso que la muestra venga sin procesar se separa el suero del coágulo, se centrifuga a 1500rpm, durante 10 minutos y 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.

### 5.3. REALIZACIÓN

- Bloqueo de las tiras de nitrocelulosa** con 0,5 ml/tira de PBS buffer pH 7.2- Tween 20 0,05% - 2% leche durante 30 minutos a 37°. Este proceso se realiza para bloquear las tiras y evitar la pegada inespecífica de proteínas.
- Adición 0,5 ml/tira de los **sueros problema y de los sueros control previamente diluidos al 1/40** en PBS buffer pH 7.2- Tween 20 0,05% - 2% leche. Incubar 45 minutos a 37° en agitación continua.
- Lavar las tiras** con PBS buffer pH 7.2- Tween 20 0,05% - 2% leche 4 veces siendo el último lavado de 5 minutos en agitación a 37°.
- Adición de 0,5 ml/tira del conjugado** Proteína A-peroxidasa preciamente diluida al 1/1000 en PBS buffer pH 7.2- Tween 20 0,05% - 2% leche. Incubar 45 minutos a 37° en agitación continua.
- Lavar las tiras** con PBS buffer pH 7.2- Tween 20 0,05% - 2% leche 4 veces siendo el último lavado de 5 minutos en agitación a 37°.
- Adición de 0,5 ml/tira del sustrato** 4-Chloro-1-naphtol preparado según se especifica en el apartado preparación de los reactivos.
- La reacción se frena entre 10-15 minutos con agua destilada.

### 5.4. TRATAMIENTO DE RESULTADOS

NOTA: Al momento de la lectura de resultados, cada tira es analizada de forma individual comparando los resultados con los controles. Siempre se debe incluir en cada ensayo CN y CP.

Los sueros que muestren un patrón específico de reacción que sea similar en mayor o menor intensidad al obtenido utilizando el control positivo serán considerados como positivos. Aquellos sueros en lo que se haya obtenido un resultado dudoso o positivo mediante la técnica de ELISA y que no reaccione claramente en mayor o menor intensidad con las proteínas del VPPA representadas en las tiras de IB serán considerados como negativos a PPA. En la siguiente figura se muestra el patrón característico obtenido por el control positivo de



<b>CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)</b>	IMMUNOBLOTTING OIE PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/IB/1/2008
		Rev. 1
		Hoja 8 de 8

**referencia** utilizando diferentes diluciones del mismo (1/2 → 1/128). La dilución 1/64 corresponde al CL suministrado por el CISA-INIA.

**Nota, visualización de bandas específicas, pero que no representan el patrón completo obtenido frente al control positivo.** En áreas endémicas de la PPA con formas crónicas de la misma y presencia de portadores inaparentes, pueden darse reacciones específicas de los sueros frente a una o varias (no todas) proteínas virales incluidas en las tiras de IB. De forma similar, esto ocurre a tiempos tempranos de infección (7-10 dpi) cuando comienza la aparición de anticuerpos específicos frente a determinadas proteínas virales. **Estos casos son considerados como situaciones especiales que tienen lugar sólo en zonas endémicas de la enfermedad. En ningún caso se consideran en zonas libres de la misma que pudieran llevar a una falsa interpretación de los resultados.**

## 5.5. PUNTOS CRÍTICOS

En los últimos años se han analizado un gran número de sueros por esta técnica con unos resultados de especificidad y sensibilidad totalmente adecuados para el diagnóstico serológico de la PPA. Sin embargo hay que tener en cuenta a la hora de la realización de la técnica una serie de puntos críticos que afectan o pueden afectar al resultado obtenido. Estos puntos críticos son;

1. **Reacciones falso negativas;** suero mal conservados y en estado de putrefacción pueden originar una reacción falso negativa al ser analizados por la técnica de IB, ya que con el tiempo llegan a perder su positividad, aunque esta se mantiene más tiempo que cuando el mismo suero se analiza por la técnica de ELISA.
2. **Reacciones falso positivas;** en algunos casos, sueros procedentes de animales que han sido vacunados frente a otros virus pueden originar reacciones falso-positivas frente a las proteínas celulares presentes en las tiras de IB. En esto casos los sueros son analizados por técnicas de Immunoblotting alternativas basadas en el uso de proteínas recombinantes como Ag.
3. **Tipo de conjugado (proteína A marcada con peroxidasa);** estudios previos realizados por el CISA-INIA cómo LNR para PPA han demostrado que el tipo de conjugado que se utiliza influye en la sensibilidad del ensayo. Los estudios realizados incluyeron la evaluación de dos tipos de conjugados comerciales (proteína A marcada con peroxidasa de SIGMA y de PIERCE), mostrando (sin perjuicio de que en el cualquier momento puedan cambiar las características de los aquí nombrados) que el uso como conjugado de la proteína A peroxidasa de PIERCE permite un incremento de la sensibilidad de la técnica. Por lo expuesto anteriormente se recomienda el uso de dicho conjugado para la realización de la técnica de IB empleando las tiras suministradas por el CISA-INIA según el protocolo descrito.

## 5.6. MEDIDAS DE SEGURIDAD

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Conservar los reactivos a la temperatura indicada antes de su utilización.
3. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
4. No utilizar las tiras una vez superada la fecha de caducidad.
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 CP y CN.