

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 1 de 10

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)

PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL

Rev. 1

Fecha de entrada en vigor: Diciembre 2008

REV.	FECHA	EPÍGRAFE/S	CAUSA DEL CAMBIO
<u>Realizado</u> Fdo.: Jovita Fernández Pinero Responsible laboratorio diagnóstico molecular Fecha:		<u>Revisado</u> Fdo.: Carmina Gallardo Responsible técnico del Laboratorio Nacional y Comunitario de PPA Fecha:	
<u>Aprobado</u> Fdo.: Marisa Arias Neira Directora Técnica del CISA Fecha:			

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 2 de 10

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)	DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 3 de 10

1. OBJETO

El presente procedimiento tiene por objeto describir el método a seguir para la detección específica del ADN del virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) en material clínico mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

2. ALCANCE

Este procedimiento es de aplicación a cualquier tipo de muestra clínica de origen porcino (EDTA-sangre, suero, homogeneizados de tejido) y a sobrenadantes de cultivos celulares. Es particularmente útil para la detección del ADN de VPPA en muestras de tejido porcino en mal estado de conservación que no son adecuadas para técnicas de aislamiento viral o detección de antígeno, o cuando el virus ha podido ser inactivado antes de la llegada de las muestras al laboratorio.

La técnica de la PCR es altamente sensible, siendo su límite de detección inferior a una partícula viral infectiva.

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 of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Capítulo 2.8.1. OIE, sexta edición, 2008. [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. D.P. King, S.M. Reid, G.H. Hutchings, S.S. Grierson, P.J. Wilkinson, L.K. Dixon, A.D.S. Bastos, T.W. Drew. 2003. **Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African Swine Fever Virus.** J. Virol. Methods, 107: 53-61.

4. GENERAL

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la detección específica del ADN del VPPA mediante la amplificación enzimática de un pequeño fragmento del genoma viral delimitado por una pareja de primers o cebadores específicos.

La técnica de PCR requiere de la extracción previa del ADN del VPPA desde el material de origen a analizar, que será el molde de la reacción enzimática. En la técnica de PCR en tiempo real, la aparición de producto amplificado es continuamente monitorizada, en equipos especiales, gracias a la incorporación en la mezcla de reacción de fluoróforos que emitirán fluorescencia de manera proporcional a la acumulación del

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 4 de 10

amplificación. Determinando la intensidad de la fluorescencia en cada ciclo de amplificación, se obtendrá una curva sigmoideal que representa la aparición de producto amplificado a lo largo de la PCR.

La PCR es una técnica rápida, que puede completarse en pocas horas, y de elevada sensibilidad, pudiendo detectar la presencia de virus incluso antes de la aparición de los primeros signos clínicos en los animales infectados.

El método descrito de PCR en tiempo real para VPPA emplea una pareja de primers diseñada en una región altamente conservada del genoma viral, VP72, que asegura la detección de un amplio rango de aislados de VPPA. Los primers amplifican un fragmento de ADN de 250 pb, entre las posiciones de nucleótidos 2041 y 2290 de la secuencia del gen completo VP72 de la cepa de referencia BA71V (nº de acceso a GenBank M34142). La sonda utilizada para la detección del producto amplificado es una sonda TaqMan situada entre las posiciones de ambos primers. La sonda está marcada en su extremo 5' con una molécula emisora de fluorescencia (6-carboxi-fluoresceína, FAM) y en el 3' con una molécula apantalladora de fluorescencia (6-carboxi-tetrametil-rhodamina, TAMRA).

5. DESCRIPCIÓN

5.1. EQUIPOS Y MATERIALES

- Balanza electrónica
- Cámara fotográfica o videocámara con impresora
- Congelador de -20
- Congelador -70
- Cubeta para geles de agarosa horizontales y accesorios (bandejas, peines, conectores)
- Fuente de alimentación
- Gradillas
- Micropipetas automática monocanal de 1-10µl.
- Micropipetas automática monocanal de 10-100µl.
- Micropipetas automática monocanal de 10-200µl.
- Micropipetas automática monocanal de 200-1000µl.
- Microcentrífuga de mesa
- Nevera de 4°C
- Reloj cronómetro
- Termobloque
- Termociclador para PCR en tiempo real (MX3005P, Stratagene)
- Transiluminador de luz ultravioleta
- Vortex

Material desechable:

- Guantes de nitrilo o látex
- Puntas de micropipeta de rangos 1-200 y 200-1000 µl, estériles
- Puntas de micropipeta con filtros resistentes a aerosoles de rangos 1-20, 20-200 y 200-1000 µl, estériles
- Tubos tipo eppendorf estériles de 0,5 ml de color ámbar.
- Tubos tipo eppendorf estériles, aptos para microcentrífuga, de volúmenes 0.2, 0.5, 1.5 y 2 ml

REACTIVOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 5 de 10

Reactivos para el paso de extracción de ADN:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (*Roche Diagnostics, ref. no. 11 796 828 001*)
- Isopropanol absoluto
- Etanol absoluto
- H₂O estéril, grado PCR.
- **Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 estéril**

CINa [Merck 1.06404]	-----	8,0 g
ClK [Merck 1.04873]	-----	0,2 g
PO ₄ H ₂ K [Merck 1.06586]	-----	0,2 g
PO ₄ HNa ₂ [Merck 1.04936]	-----	1,15 g
H ₂ O destilada	-----	1000 ml

Conservación; temperatura ambiente

Reactivos para el paso de amplificación/detección de ADN:

- H₂O estéril libre de nucleasas, grado PCR.
- *QuantiFast Probe PCR kit*, distribuido comercialmente por *Qiagen (Ref. 204352, 100 reacciones; ref. 204354, 500 reacciones)*.
- Sonda TaqMan a una concentración de uso de 10 pmol/μl:
5'-FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-TAMRA-3'
- Primers a una concentración de uso de 20 pmol/μl:
 - secuencia primer **PPA-King-S**: 5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3' (primer forward);
 - secuencia primer **PPA-King-S**: 5'-GATACCACAAGATCRGCCGT-3' (primer reverse).

5.2. PREPARACIÓN

Mediante la técnica de PCR descrita se pueden analizar distintos tipos de muestra como sobrenadantes de cultivo celular, sangre recogida en EDTA, suero y homogeneizados de tejidos, incluso cuando éstos últimos han sido conservados en condiciones no adecuadas y están putrefactos.

Preparación de muestras:

- Se recomienda en el caso de muestras de sangre-EDTA, analizar siempre las muestras sin diluir.
- Para el análisis de muestras de órganos y tejidos, se debe preparar primero un homogeneizado del mismo en PBS estéril al 1/10. Posteriormente, centrifugar para clarificar a 12,000 g durante 5 minutos. Emplear para el análisis el fluido sobrenadante recuperado. Si éste no es muy claro, puede ser recomendable procesar una dilución 1/10 del sobrenadante en paralelo con el material no diluido.

5.3. REALIZACIÓN

5.3.1 Método de extracción del ADN

5.3.1 Método de extracción del ADN

El método de extracción del ADN de VPPA que se describe emplea el kit comercial **High Pure PCR Template Preparation Kit** (*Roche Diagnostics*). Este sistema tiene la ventaja de poder ser utilizado para la extracción simultánea del ADN de VPPA y del ARN del virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC), que va a facilitar la detección simultánea de ambos virus en una única reacción si se emplea un método de PCR múltiple (Agüero et al., 2004).

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 6 de 10

Controles positivos y negativos de extracción:

Se deben incluir al menos un control positivo y un control negativo en cada proceso de extracción. Las muestras controles serán homogeneizados de tejido 1/10, muestras de suero o sangre EDTA, correspondiendo al mismo tipo de material clínico que las muestras a analizar. El control negativo serán 200 µl de agua o material clínico negativo a VPPA; el control positivo serán 200 µl de homogeneizado, suero o sangre-EDTA positivo a VPPA. Es muy recomendable que el control positivo esté próximo al límite de detección de la técnica, que servirá para validar el rendimiento del método de extracción del ADN. Ambos controles serán incluidos en todo el procedimiento y procesados conjuntamente con las muestras a analizar.

Protocolo de extracción de ADN con el High Pure PCR Template Preparation Kit:

El *High Pure PCR Template Preparation Kit* incluye los siguientes reactivos: Binding Buffer, Proteinasa K, Inhibitor Removal Buffer, Wash Buffer, y los tubos con filtro de sílica y tubos colectores, necesarios para el proceso de extracción de ADN.

Durante el proceso de extracción, las células son inicialmente lisadas durante una corta incubación con proteinasa K en presencia de una sal caotrópica (HCl guanidina), que inmediatamente inactiva todas las nucleasas. Los ácidos nucleicos se unen o adsorben selectivamente al filtro de fibra de vidrio (sílica) en un tubo de centrifuga especial. Los ácidos nucleicos permanecen unidos al filtro durante los siguientes pasos de lavado y centrifugado, donde se eliminan las moléculas celulares contaminantes, sales y proteínas. Finalmente, los ácidos nucleicos son eluidos del filtro añadiendo H₂O estéril, grado PCR.

Preparación de soluciones de trabajo:

- Proteinasa K liofilizada: resuspender la proteinasa K en 4,5 ml de agua destilada estéril. Alicuotar en viales de 500 µl y mantener a -20°C hasta su uso.
- Inhibitor Removal Buffer: añadir 20 ml de etanol absoluto al vial original. Etiquetar y marcar la fecha en la botella.
- Wash Buffer: añadir 80 ml de etanol absoluto al vial original. Etiquetar y marcar la fecha en la botella.

Protocolo de extracción de ADN de VPPA:

1. Poner 200 µl/tubo de *binding buffer*.
2. Añadir 40 µl de Proteinasa K 20 mg/mL.
3. Añadir 200 µl de muestra.
4. Mezclar invirtiendo los tubos e incubar 10 min a 72°C. Centrifugar unos segundos, un pulso de centrifuga, para eliminar restos de muestra en la tapa.
5. Añadir 100 µl de isopropanol.
6. Mezclar agitando en vortex. Centrifugar unos segundos, un pulso de centrifuga, para eliminar restos de muestra en la tapa.
7. Pasar la mezcla al *High pure filter tube* colocado sobre un tubo colector. Centrifugar 1 min a 8.000 rpm (Con muestras de sangre, repetir el paso de centrifugación si queda muestra sobre el filtro).
8. Descartar el tubo colector y colocar el tubo columna sobre un nuevo tubo colector
9. Añadir 500 µl *Inhibitor Removal buffer*. Centrifugar 1 min a 8.000 rpm
10. Descartar el tubo colector y colocar el tubo columna sobre un nuevo tubo colector.
11. Añadir 450 µl de Wash buffer. Centrifugar 1 min a 8.000 rpm.
12. Descartar el tubo colector y colocar el tubo columna sobre un nuevo tubo colector.
13. Repetir el paso de lavado.
14. Centrifugar sobre un tubo vacío a 13.000 rpm 10 seg.
15. Colocar la columna sobre un tubo de 1,5 ml con tapa.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 7 de 10

16. Añadir 50 µl de agua destilada estéril, precalentada a 70°C, asegurando que cubre totalmente el filtro (no emplear el buffer de elución incluido en el kit si se quiere extraer también ARN de VPPC). Centrifugar 1 min a 8.000 rpm.
17. Recoger el eluido conteniendo el ADN y guardar a -20°C hasta su uso (o a 4°C si se va a emplear en 1-2 h desde su obtención).

5.3.2 Reacción de amplificación del ADN:

Aspectos generales:

- El ensayo amplifica un fragmento de ADN de 250pb dentro de la región VP72 del genoma de VPPA.
- La PCR se realiza en un volumen final de 20 µl.
- La sonda TaqMan debe mantenerse siempre protegida de la luz.
- Tras la preparación de la mezcla de reacción, se añadirán 2 µl de ADN extraído a cada tubo de reacción.
- Se deben incluir, en cada carrera de PCR, al menos un control positivo (2 µl de ADN de VPPA, a una dilución próxima al límite de detección de la técnica) y un control negativo de reacción (2 µl de agua destilada, grado PCR).

Preparación de la mezcla de reacción:

- En un tubo de microcentrifuga de 0.5 ml estéril (color ámbar), se preparará la mezcla de PCR, según se describe a continuación, para el número total de muestras a analizar (incluyendo los controles positivos y negativos de extracción y reacción) más, al menos, una muestra adicional (para compensar posibles errores de pipeteo). Preparar la mezcla de PCR evitando la luz directa.
- Mezcla de PCR para una muestra: H₂O estéril libre de nucleasas, grado PCR (6,7 µl), 2 × PCR master mix (10 µl), primer PPA-King-s 20 pmol/µl (0,4 µl), primer PPA-King-a 20 pmol/µl (0,4 µl), sonda TaqMan 10 pmol/µl (0,5 µl).
- Añadir 18 µl de mezcla de PCR al número de tubos de PCR de 0,2 ml de calidad óptica necesarios.

Adición de la muestra:

- Añadir 2 µl de ADN molde a cada tubo de PCR.
- Incluir un control positivo (2 µl de ADN de VPPA, a una dilución próxima al límite de detección de la técnica) y un control negativo de reacción (2 µl de agua destilada, grado PCR) en cada carrera de PCR.
- Después de añadir la muestra, cerrar bien los tubos y dar un golpe de centrifuga para bajar la mezcla de PCR. Colocar los tubos en un termociclador automatizado para PCR en tiempo real y correr el programa de incubación detallado a continuación.

Programa de incubación:

Activación de TaqGold DNA pol	95°C ---- 3 min	
Desnaturalización ADN	95°C ---- 10 seg	}
Anillamiento/elongación	58°C ---- 30 seg	
		45 ciclos

Programar la lectura de fluorescencia en el canal FAM al final de cada ciclo.

5.4. TRATAMIENTO DE RESULTADOS

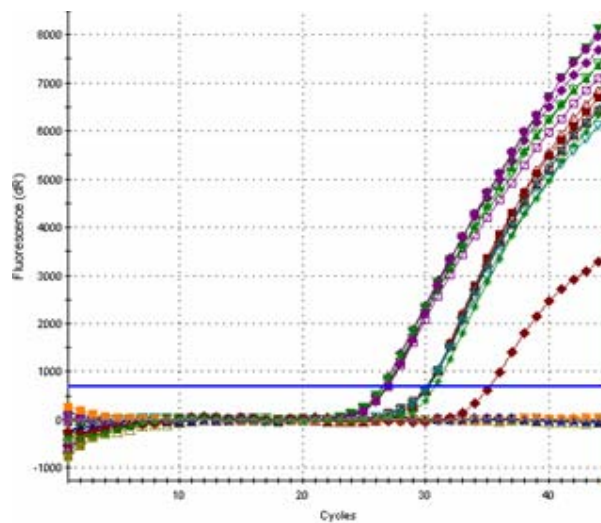
El punto en el cual la fluorescencia pasa de niveles no significativos (indistinguibles del fondo) a niveles claramente detectables, se denomina ciclo umbral (*Ct: Cycle threshold*), y éste será el valor umbral de intensidad de fluorescencia a partir del cual una muestra será considerada positiva. El ciclo umbral es

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 8 de 10

inversamente proporcional a la cantidad de ADN molde presente en la mezcla de reacción al inicio de la misma, es decir en la muestra analizada.

En una muestra positiva se obtendrá una curva sigmoideal representando el n° de ciclos frente al valor de fluorescencia emitido, donde el valor de Ct será menor de 40. Una muestra negativa mantendrá su perfil de fluorescencia por debajo del valor umbral y el equipo no reportará ningún valor de Ct (ver figura).

El procedimiento se considerará válido si los controles positivos de extracción y reacción muestran unos valores de Ct de 32 ± 2 , y los controles negativos de extracción y reacción no dan valor de Ct.



5.5. PUNTOS CRÍTICOS

Siendo una de las ventajas de la técnica de PCR su elevada sensibilidad, el punto crítico durante todo el proceso de análisis es el riesgo de contaminación de las muestras, y por tanto, los posibles falsos positivos que en este caso se obtendrían. La contaminación puede deberse al propio VPPA presente en los controles positivos empleados en el proceso de extracción, o al ADN del VPPA resultante de la amplificación de un ensayo anterior. Por ello, es **imprescindible seguir y cumplir unas estrictas normas de trabajo para minimizar el riesgo de contaminación intrínseco a la técnica de PCR:**

- Todos los pasos que implican el análisis de muestras por PCR se realizarán en espacios diferenciados, con equipamiento y material específico para cada uno: preparación de muestras, extracción de ADN, montaje de mezcla de PCR, y eliminación de los productos de PCR.
- Trabajar siempre con guantes de látex o nitrilo limpios en el laboratorio de PCR.
- Cada vez que el técnico, que esté realizando el análisis, acceda a una zona de PCR diferente, deberá cambiarse los guantes desechando los que tenía puestos.
- El material será de uso exclusivo para el paso del procedimiento para el que esté destinado por su situación/identificación.
- Utilizar una punta de pipeta diferente cada vez que se pipetee en un tubo conteniendo alguna muestra.
- Nunca se abrirán los tubos con producto amplificado en otro laboratorio que no sea el destinado exclusivamente al análisis de los mismos mediante electroforesis, en el que serán eliminados.

5.6. MEDIDAS DE SEGURIDAD

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008
		Rev. 1
		Hoja 9 de 10

- Leer y seguir cuidadosamente el protocolo.
- Conservar los reactivos a la temperatura indicada antes de su utilización.
- No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
- Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
- No utilizar los reactivos una vez superada la fecha de caducidad.
- No comer, beber ni fumar en el laboratorio.
- No pipetear los reactivos con la boca.
- Utilizar siempre guantes de látex o nitrilo.
- El *binding buffer*, *inhibitor removal buffer* y *wash buffer* incluidos en el kit de extracción de ADN contienen derivados de guanidina que son irritantes, por lo que deben ser manipulados con precaución. En caso de contacto con piel, mucosas y/o ojos, lavar inmediatamente con agua abundante. Si ocurre un vertido accidental, diluir con agua antes de limpiar.
- Las sondas utilizadas para la detección del producto amplificado son altamente sensibles a la luz, por lo que deben manipularse únicamente en el momento de uso y mantenerse siempre protegidas de la luz (utilizar tubos color ámbar para conservar el stock de sondas y preparar la mezcla de reacción).

5.7. CONTROL DE CALIDAD

