



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal



**PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA DE  
ELISA, MEDIANTE KIT COMERCIAL,  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PESTE  
PORCINA AFRICANA**

[jmvizcaino@vet.ucm.es](mailto:jmvizcaino@vet.ucm.es)  
Av/ Puerta de Hierro s/n.  
28040 Madrid.

Tel: (34) 913944082  
Fax: (34) 913943908



## 1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Rotulador permanente.
- Vaso de precipitados.
- Guantes de latex o nitrilo
- Gradilla para tubos de 10ml.
- Un tubo de 10 ml.
- Placa antigenada.
- Placa No Tratada.
- Pipeta multicanal.
- Pipet boy.
- Micropipeta de 200  $\mu$ l.
- Pipetas serológicas
- Papel de aluminio.
- Estufa de 37 °C
- Reactivos suministrados por el kit PPA

## 2. METODOLOGÍA

- 2.1 Numerar previamente la placa donde vamos a diluir los sueros, identificando dónde irán los controles.
- 2.2 Dilución de las muestras y controles:  
*50  $\mu$ l de suero + 50  $\mu$ l de diluyente*
- 2.3 Numerar la placa antigenada, identificando los controles.
- 2.4 Traspasamos las muestras y controles diluidos a la placa antigenada.
- 2.5 Tapamos con una pegatina adhesiva e incubación durante 1 hora a 37 °C la placa, tapando ésta con una pegatina adhesiva.
- 2.6 Lavar la placa 4 veces.
  - *Solución de lavado*: Diluir la solución de lavado proporcionada por el kit en 24 partes de agua destilada. (Por ej: 40 ml de concentrado + 960 ml de agua destilada).



2.7 Preparación y adición del conjugado. Añadir 100 µl de conjugado por pocillo.

➤ *Realizar una dilución 1/100 en el diluyente suministrado.  
(110 µl de conjugado + 11 ml de diluyente)*

2.8 Tapamos la placa con una pegatina adhesiva e incubamos durante 30 minutos a 37 °C.

2.9 Lavado de la placa 4 veces.

2.10 Añadir 100 µl de sustrato.

2.11 Incubación durante 15 minutos en la oscuridad.

2.12 Añadir 100 µl de solución de frenado.

2.13 Lectura de la Densidad Óptica (DO) de la placa a 450 nm.

### 3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

➤ *Validación del test:*

$$\frac{DO \text{ Control Negativo}}{DO \text{ control Positivo}} > 4$$

➤ *Puntos de corte:*

- **Punto de Corte Positivo:**  $CN - ((CN-CP) \times 0,5)$
- **Punto de Corte Negativo:**  $CN - ((CN-CP) \times 0,4)$

➤ *Interpretación de resultados:*

- **Muestra Positiva:**  $DO < \text{Punto de Corte Positivo}$
- **Muestra Negativa:**  $DO > \text{Punto de Corte Negativo}$
- **Muestra dudosa:**  $DO \text{ entre ambos Puntos de Corte}$

❖ *Abreviaturas:*

**CN:** Control Negativo  
**CP:** Control Positivo  
**DO:** Densidad Óptica