



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal



**PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA DE
ELISA (OIE) PARA EL DIAGNOSTICO
SEROLOGICO DE PESTE PORCINA
AFRICANA
(ESPAÑOL)**

jmvizcaino@vet.ucm.es

Av/ Puerta de Hierro s/n.
28040 Madrid.

Tel: (34) 913944082

Fax: (34) 913943908



1. MATERIALES Y REACTIVOS :

- Micropipeta automática monocanal de 1-10 μ l
- Micropipeta automática monocanal de 10-100 μ l
- Micropipeta automática monocanal de 10-200 μ l
- Micropipeta automática monocanal de 200-1000 μ l
- Puntas de pipetas desechables
- Papel adsorbente.
- Papel de aluminio
- Micropipetas automáticas multicanal de 5-50 μ l
- Micropipetas automáticas multicanal de 50-300 μ l
- Placas de microtitulación (ref: 469957.NUNC)
- Estufa de 37°C
- Balanza
- Agua destilada
- pH metro
- Vortex
- Tubos de plástico estériles (10ml, 50ml)
- Espectrofotómetro UV/VIS de placas con filtro 620 nm anexo a un programa de ordenador para poder registrar e imprimir las lecturas.
- Centrífuga de mesa
- Guantes de latex o nitrilo
- Pipeteador automático Pipetboy o similar
- Pipetas de plástico estériles para descargar 1-10ml
- **Ag**: Antígeno suministrado por el laboratorio de referencia PPA en viales liofilizados de 0,5 ml, 1ml ó 2ml. Una vez reconstituido, conservar en alícuotas a -20°C. Caduca a los 18 meses.
- **PC**: Controles positivos suministrados por el laboratorio de referencia PPA en viales liofilizados de 0,5 ml, 1ml ó 2ml. Una vez reconstituido, conservar en alícuotas a -20°C. Caduca a los 18 meses.
- **LC**: Suero límite de referencia suministrado por el laboratorio de referencia PPA en viales liofilizados de 0,5 ml, 1ml ó 2ml. Una vez reconstituido conservar en alícuotas a -20°C. Caduca a los 18 meses.
- **NC**: Suero control negativo de referencia suministrado por el laboratorio de referencia PPA en viales liofilizados de 0,5 ml, 1ml ó 2ml. Una vez reconstituido conservar en alícuotas a -20°C. Caduca a los 18 meses.
- **CONJUGADO**: Proteína A peroxidasa 1mg/ml



• **TAMPÓN CARBONATO-BICARBONATO 0,05M (Ph 9,6):**

1,59 gr ----- Na₂CO₃
2,93 gr ----- NaHCO₃
1 l. ----- Agua destilada

Guardar a T^a ambiente. Para ajustar el Ph a 9,6:

↑ pH: Bicarbonato Sódico

↓ pH: Carbonato Sódico

• **PERÓXIDO DE HIDROGENO (H₂O₂)**

Usar al 30 %.

• **SOLUCIÓN DE LAVADO; BUFFER PBS-TWEEN Ph 7,2:**

ClNa ----- 8 gr
ClK ----- 0,2 gr
PO₄H₂K ----- 0,2 gr
PO₄HNa₂ ----- 1,15gr
Tween-20 ----- 0,5 ml
H₂O destilada ----- 1000 ml

Conservar a T^a ambiente. Comprobar el pH antes de usar.

• **SOLUCIÓN SUSTRATO:**

❖ **DMAB (Ácido 3 Dimetilaminobenzoico):**

Disolver 13,315 gr DMAB en 900 ml de *Tampón fosfato 0,1 M pH 7*

-Tampón fosfato 0,1 M pH 7:

5,3 g ----- PO₄H₂K
8,65 g ----- PO₄HNa₂
1 l. ----- H₂O destilada

Agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, ajustando el pH a 7 con NaOH 5M. Ajustar el volumen final a 1 l. Filtrar y preparar alícuotas de 10ml y 5ml. Conservar a -20°C en oscuridad.



❖ **MBTH -3- metil-2-benzotiazolinona hidracina hidroclorida monohidrato:**

Disolver 0,3646 gr del ácido MBTH en 900 ml de *tampón fosfato 0,1 M pH 7*. Agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, ajustando el pH a 6,25 con HCl concentrado. Después, ajustar el volumen final a 1 litro. Filtrar y preparar alícuotas de 10ml y 5ml.
Conservar a -20°C en oscuridad.

• **SOLUCIÓN DE FRENADO (Ácido Sulfúrico 3N):**

Ácido Sulfúrico ----- 16,1 ml (en 200 ml agua destilada).
Conservar a temperatura ambiente.

2. **METODOLOGÍA:**

NOTA: Antes de comenzar el ensayo antigenar la placa que se va a usar según se describe a continuación. Para la realización de este video hemos partido de una placa antigenada.

Antigenar la placa con el tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6 + el Ag, 100 µl por pocillo. Una vez hecho esto, incubar a 4° durante 18h (toda la noche). Las placas ya antigenadas y secas se pueden guardar a -20°C si no se van a usar inmediatamente.

➤ ***Preparación del Ag:***

*6,25 µl de Ag + 9,999 µl Tampón Carbonato-Bicarbonato = Ag 1:1600
Con estas proporciones tenemos para antigenar una placa*

2.1 Lavar la placa antigenada 4 veces con la solución de lavado y secar con papel.

2.2 Diluir los sueros y los controles a una dilución 1/30 en PBS/Tween-20.

- Adición de **98,6 µl PBS 0,5 Tween-20** a la placa NO TRATADA.
- Identificar la placa NO TRATADA en la que vamos a diluir las muestras y controles.
- Adición de **3,4 µl de muestras y controles.**



- 2.3** Pasamos 100 μ l de cada suero y control diluido a la placa antigenada por duplicado.
- 2.4** Tapamos la placa con plástico adhesivo e incubamos 1h a 37 °C en agitación.
- 2.5** Lavar las placas 4 veces con la solución de lavado. Luego secar con papel.
- 2.6** Preparación del conjugado:
- Adición de **2 μ l Proteína A** a **9 998 μ l de μ l PBS 0,5 Tween-20**
(*volúmenes para una placa*).
- 2.7** Añadir 100 μ l de conjugado a la placa
- 2.8** Tapamos la placa con plástico adhesivo e incubar 1 h a 37 °C en agitación.
- 2.9** Lavar las placas de nuevo 4 veces con la solución de lavado. Después secar con papel.
- 2.10** Preparación de la solución de sustrato.

10 ml de DMAB + 10 ml de MBTH + 5 μ l H₂O₂ (30%)
(volumen para 1 placa)
- 2.11** Añadir 200 μ l de la solución de sustrato.
- 2.12** Incubar, en la oscuridad aproximadamente 5-10 minutos a temperatura ambiente, hasta observar que los pocillos con los controles negativos comienzan a cambiar de color. Tapar la placa con papel de aluminio o similar.
- 2.13** Frenar la reacción añadiendo 50 μ l solución de frenado.
- 2.14** Leer las placas. Los resultados se obtienen leyendo las placas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm.



3. RESULTADOS

➤ VALIDACIÓN DEL TEST:

El test será considerado válido cuando la DO del CP (Control Positivo) sea por lo menos 4 veces mayor que la DO del CN (Control Negativo).

$$DO PC \geq 4 DO NC$$

Valor de la DO CP debe ser ≥ 1.0

Valor de la DO CN debe ser ≤ 0.250

Valor de la DO CL deber estar en el rango del Cut Off, con un valor de DO de 0,7.

➤ CÁLCULO DEL PUNTO DE CORTE:

$$CUT OFF = (DO Suero negativo) + (DO Suero positivo \times 0,2)$$

- Negativo será: DO por debajo de CUT OFF -0,1.
- Positivo será: DO por encima de CUT OFF + 0,100.
- Dudoso será: DO entre CUT OFF +/- 0,100. Estos serán confirmados por la técnica de IB.