



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal



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

jmvizcaino@vet.ucm.es

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

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



1. MACERADO DE TEJIDOS

1.1. MATERIALES

- Bandeja con hielo.
- Lejía al 50 %.
- Tijeras y pinzas.
- Maceradores.
- Cinta adhesiva.
- Rotulador permanente.
- Gradilla para tubos de 10ml.
- Gradilla para tubos de microcentrífuga.
- Bateas para los tejidos.
- Pipetas serológicas.
- PBS 1X.
- Vaso de precipitados.
- Papel adsorbente.
- Guantes de latex o nitrilo
- Pipeteador automático Pipetboy o similar

1.2. REACTIVOS:

PBS Buffer Ph 7.2:

NaCl	(Merck 1.06404)	8.0 g
KH ₂ PO ₄	(Merck 1.04873)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	(Merck 1.06586)	2.9 g
KCl	(Merck 1.04936)	0.2 g
H ₂ O Destilada		1000ml



1.3. METODOLOGÍA

- 1.3.1. Identificamos las bateas.
- 1.3.2. Cortamos 1gr aproximadamente de tejido.
- 1.3.3. Identificamos los maceradores.
- 1.3.4. Introducimos la muestra en el macerador.
- 1.3.5. Añadimos 10ml de PBS 1X y maceramos.
- 1.3.6. Identificamos los tubos de microcentrífuga.
- 1.3.7. Alicuotamos el contenido del macerador en los tubos de microcentrífuga.
- 1.3.8. Guardamos a -20 °C si se va a usar en las próximas 24 horas. Si no es así, se guardará a -80°C.

2. EXTRACCIÓN DE ADN

2.1. MATERIALES

- Bandeja con hielo.
- Lejía al 50 %.
- Rotulador permanente.
- Gradilla para tubos de microcentrífuga.
- Flotadores.
- Baño termostático.
- Centrífuga.
- Vaso de precipitados.
- Guantes de latex o nitrilo
- Isopropanol.
- Vortex
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics,ref:11796828001)



❖ **Preparación de las soluciones de trabajo:**

- **Proteinasa K liofilizada:** resuspender el vial que nos proporciona el kit 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 20ml de etanol absoluto al vial original. Etiquetar y poner la fecha en el vial.
- **Wash Buffer:** añadir 80ml de etanol absoluto al vial original. Etiquetar y poner la fecha en el vial.

2.2. METODOLOGÍA

- 2.2.1 Identificamos los tubos de microcentrífuga.
 - 2.1.1 Añadir 200µl a cada tubo de **Binding Buffer**.
 - 2.1.2 Añadir 40 µl de Proteinasa K
 - 2.1.3 Añadir 200µl de la muestra.
 - 2.1.4 Mezclar por inversión.
 - 2.1.5 Incubar 10 minutos a 72 °C en el baño.
 - 2.1.6 Dar un pulso de centrífuga a los tubos.
 - 2.1.7 Añadir 100 µl de isopropanol.
 - 2.1.8 Mezclar y dar un pulso en la centrífuga.
 - 2.1.9 Identificar las columnas con filtro (High pure filter tube) que vayamos a utilizar y traspasamos el contenido del tubo de microcentrífuga a la columna con filtro.
 - 2.1.10 Centrifugar 1 min. a 8000 r.p.m
 - 2.1.11 Descartar el filtrado
 - 2.1.12 Añadir 500 µl de Inhibitor Removal Buffer.
 - 2.1.13 Centrifugar 1 min. a 8000 r.p.m
 - 2.1.14 Descartar el filtrado.
 - 2.1.15 Añadir 450 µl de Wash Buffer.
 - 2.1.16 Centrifugar 1 min. a 8000 r.p.m
 - 2.1.17 Descartar el filtrado.
 - 2.1.18 Añadir 450 µl de Wash Buffer, de nuevo.
 - 2.1.19 Centrifugar 1 min. a 8000 r.p.m
 - 2.1.20 Descartar el filtrado.
 - 2.1.21 Centrifugar 13000 r.p.m durante 10 seg.
 - 2.1.22 Precaentamos el agua destilada.
 - 2.1.23 Identificar los tubos de microcentrífuga donde quedará el DNA.
 - 2.1.24 Introducir el filtro en el tubo de microcentrífuga identificado.
 - 2.1.25 Añadimos 50 µl de agua destilada estéril, precalentada a 70 °C.
 - 2.1.26 Centrifugar 1 min. a 8000 r.p.m
 - 2.1.27 Descartar el filtro y guardar el eluido a -20 °C



3. PCR A TIEMPO REAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS:

- H₂O estéril libre de nucleasas, grado PCR.
- QRT-PCR Master Mix 2X Brilliant II (Stratagene).
- Sonda Taq Man a una concentración de 10 pmol/μl:
5'-FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-TAMRA
- Primers a una concentración de uso de 20 pmol/μl:
 - primer **King-s** secuencia 5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA - 3' (forward)
 - primer **King-a** secuencia 5'-GATACCACAAGATCRGCCGT -3' (reverse)

3.2 METODOLOGÍA.

3.2.1 Preparación del MIX de reacción:

- En un tubo de microcentrífuga de 1.5ml estéril, 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)
- Mezcla de PCR para una muestra:

<u>REACTIVOS</u>	<u>VOLUMEN</u> (25 μl reacción)
2X PCR Master Mix	12,5 μl
primer FWD 20 μM	0,5 μl
primer REW 20μM	0,5 μl
Sonda TaqMan 10μM	0,63 μl
H₂O	8,87 μl



- 3.2.2 Añadir 23 μ l de mezcla de PCR al número de tubos de PCR de 0,2 ml necesarios.
- 3.2.3 Añadir 2 μ l de ADN molde a cada tubo de PCR.
- Incluir un control positivo (2 μ l de ADN de VPPA) y un control negativo de reacción (2 μ l de agua destilada, grado PCR) en cada carrera PCR.
- 3.2.4 Cerrar bien los tubos y mezclar adecuadamente. Numerar e identificar los tubos.
- 3.2.5 Colocar los tubos de PCR en un termociclador Real-time y correr el siguiente **Programa de incubación:**

Activación de la ADN pol.	95 °C ---- 3 min.	
Desnaturalización ADN	95 °C ----- 10 seg	} 45 ciclos
Anillamiento y elongación de los primers	58 °C ----- 30 seg	

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

3.3 RESULTADOS E INTERPETACIÓN

El procedimiento será válido si tanto en la extracción y la reacción de los controles positivos dan un valor Ct de 32 ± 2 , y tanto la extracción y la reacción de los controles negativos no presentan ningún valor Ct.

En una muestra positiva, la amplificación que se obtendrá será en forma de curva sigmoide, indicando el número de ciclos de lectura en comparación con el nivel de fluorescencia, donde el valor del Ct estará por debajo de 40. Una muestra negativa mantendrá un perfil de fluorescencia bajo y el equipo no dará ningún valor de Ct.

Si el valor del Ct es mayor de 38 y la curva de amplificación que se obtiene es sigmoidal, esas muestras serán consideradas como dudosas y el análisis debe repetirse para su confirmación.

Si el valor del Ct es mayor de 38 y la curva de amplificación que se obtiene tiene una forma lineal, las muestras serán consideradas como negativas.