

CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE PPA REV. 2014	PNT/CISA/PPA/IPT/1
		Página 1 de 7

CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (CISA-INIA)

Laboratorio de Referencia de la UE de PPA (EURL-ASF)

Centro de Investigación en Sanidad Animal
CISA-INIA, Valdeolmos 28130, Madrid, Spain.

Contacto

Dr. Carmina Gallardo
Virginia Pelayo

E-mail: eurl.asf@inia.es



EU Reference Laboratory for ASF
Animal Health Research Centre
(CISA), INIA
Ctra Algete-El Casar s/n
28130, Valdeolmos, Spain



PNT/CISA/PPA/IPT/1

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT): DETECCIÓN
DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE
PORCINA AFRICANA MEDIANTE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA
(IPT)

CONTENIDO	
1.	OBJETO.
2.	ALCANCE.
3.	REFERENCIAS.
3.1.	DOCUMENTOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN.
3.2.	DOCUMENTOS (PNTs) A UTILIZAR CONJUNTAMENTE.
4.	GENERALIDADES.
5.	REALIZACIÓN.
5.1.	MATERIALES Y REACTIVOS.
5.2.	PREPARACIÓN.
5.3.	REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA.
5.4.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.
5.5.	PUNTOS CRÍTICOS
5.6.	MEDIDAS DE SEGURIDAD.

CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE PPA REV. 2014	PNT/CISA/PPA/IPT/1 Página 2 de 7
------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

1. OBJETO.

El presente procedimiento tiene por objeto describir el método para la realización de la técnica de la Inmunoperoxidasa para la detección de anticuerpos específicos frente al VPPA utilizando como soporte células de riñón de mono infectadas con el VPPA.

2. ALCANCE.

Este procedimiento es de aplicación a muestras de suero porcino, exudados de tejidos porcinos y muestras de sangre seca en papel de filtro.

3. 3. REFERENCIAS.

3.1. DOCUMENTOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN.

1. Gallardo C, Soler A, Nieto R, Carrascosa AL, De Mia GM, Bishop RP, Martins C, Fasina FO, Couacy-Hymman E, Heath L, Pelayo V, Martín E, Simón A, Martín R, Okurut AR, Lekolol I, Okoth E, Arias M. "Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE internationally prescribed serological tests". Vet Microbiol. 2013 Feb 22;162(1):32-43. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.08.011. Epub 2012 Aug 18.
2. Pan IC, Huang TS, Hess WR. "New method of antibody detection by indirect immunoperoxidase plaque staining for serodiagnosis of African swine fever". J Clin Microbiol. 1982 Oct;16(4):650-5.

PPA REVISIONES:

1. Arias, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2012). African swine fever. In: Zimmerman, J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J, Stevenson, G.W. (Eds), Diseases of swine, 10th Edition. John Wiley and Sons, United States of America, pp. 396-404.
2. 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". On line, July, 2002. [<http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/7/7-ppa.htm>]
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). RECOGNIZING AFRICAN SWINE FEVER. A FIELD MANUAL. 2000 Edition.

[<http://www.fao.org/docrep/004/X8060E/X8060E00.HTM>]

3.2. DOCUMENTOS A UTILIZAR CONJUNTAMENTE.

- PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (PNT/CISA/PPA/MUESTRAS/1).
- DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA MEDIANTE ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA) INDIRECTO (PNT/CISA/PPA/ELISA/1)

4. GENERALIDADES.

4.1. ABREVIATURAS.

IPT; técnica de la inmunoperoxidasa
MS; células de riñón de mono
m.o.i; multiplicidad de infección
PPA: Peste porcina africana
r.p.m.: revoluciones por minuto
VERO: células de riñón de mono
VPPA: Virus de la Peste Porcina Africana.

4.2. PRINCIPIO.

El VPPA infecta naturalmente a células del sistema inmune, los monocitos-macrófagos. Se ha descrito la persistencia del virus inducida experimentalmente en células de riñón de mono (VERO y MS) mediante la acción del CINH₄ y por la acción de 5-iodo-2'-desoxiuridina. El VPPA se multiplica en el citoplasma celular aunque necesita también el núcleo celular para su replicación. La penetración del virus en la célula sucede mediante endocitosis, formándose vesículas que pueden englobar varios viriones que fusionan sus envueltas con la membrana del endosoma liberándose así al citoplasma celular. En los cultivos de células se ha observado la existencia de un receptor que interviene en el proceso. Posteriormente y cerca del

CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE PPA REV. 2014	PNT/CISA/PPA/IPT/1 Página 3 de 7
------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

núcleo de la célula empieza a formarse una zona membranosa que va aumentando y que luego da lugar a estructuras de tipo helicoidal o de racimo con virus incompletos de forma poliédrica y la asociación de ribosomas con las envueltas del virus. El virus intracelular completo emigra hacia la membrana de la célula y se libera a través de ésta adquiriendo una nueva envuelta de origen celular modificada por inclusión de proteínas víricas

La **técnica de la Inmunoperoxidasa** es una técnica **inmunocitoquímica** que se aplica a células fijadas sobre un soporte celular determinándose la unión antígeno-anticuerpo mediante el uso de enzimas como la peroxidasa. En el procedimiento que aquí se describe, células VERO o MS son infectadas con VPPA adaptados a estos cultivos celulares. Las células infectadas se fijan y se utilizan como soporte para la determinación de la presencia de anticuerpos específicos frente al VPPA en las muestras problemas mediante el uso de la enzima peroxidasa. **Esta técnica se utiliza cómo técnica de confirmación en muestras dudosas o positivas mediante la técnica de ELISA.**

La **técnica de IPT** ha sido recientemente validada en el EURL cómo **técnica alternativa de confirmación para la detección de anticuerpos frente al VPPA tanto en sueros cómo en exudados de tejidos porcinos. Los valores de sensibilidad y especificidad (98,20% y 98,95%, respectivamente) son comparables a la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).**

5. REALIZACIÓN.

5.1. MATERIALES Y REACTIVOS.

MATERIAL

- Agitador/incubador 37±2°C.
- Balanza electrónica.
- Botellas estériles de 250ml y 500 ml.
- Cabina de flujo laminar clase II
- Congelador de <-10°C.

- Congelador ≤-70°C.
- Cubetas desechables.
- Frascos de cultivo, T25, T75 y T150 [Falcon].
- Guantes de látex o de nitrilo.
- Incubador CO₂ (±0.5%) / 37±3°C.
- Micropipetas automáticas monocanal de 1-10 µl.
- Micropipetas automáticas monocanal de 10-200 µl.
- Micropipetas automáticas monocanal de 200-1000 µl.
- Micropipetas automáticas multicanal de 1-10 µl.
- Micropipetas automáticas multicanal de 5-50 µl.
- Micropipetas automáticas multicanal de 50-200 µl.
- Microscopio invertido de contraste de fases.
- Nevera de 4±3°C.
- Papel de aluminio.
- Papel absorbente.
- pHmetro (0,01 UpH).
- Placas de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano [NUCLONTM "Surface, NUNC o características similares].
- Pipeteador automático Pipetboy acu o equivalente.
- Pipetas de vidrio o plástico, estériles, para descargar 1-25 ml.
- Puntas de pipetas desechables de 1-20, 20-200 and 200-1000 µl..
- Reloj cronómetro.
- Tubos eppendorf (o equivalentes) de 0,5 ml, 1,5 ml y 2 ml.
- Tubos de plástico estériles de 10 ml y 50 ml.
- Vórtex.

REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT:

- **ASFV-IPT:** Placas de 96 pocillos de células VERO o células MS infectadas con el aislado español Ba71VVERO (p72 genotipo I) o E70MS (genotipo I) respectivamente. *Conservar a <-10°C. Fecha de caducidad: 6 meses*
- **CP:** Control positivo de referencia producido y suministrado por el CISA-INIA en viales liofilizados de 0,5 ml, 1 ml o 2 ml.

CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE PPA REV. 2014	PNT/CISA/PPA/IPT/1
		Página 4 de 7

- Conservación: 4±3°C, liofilizado. Una vez resuspendido, alicuotar y conservar a <-10°C (fecha de caducidad: 18 meses).
- **CL:** Control límite de referencia producido y suministrado por el CISA-INIA en viales liofilizados de 0,5 ml, 1 ml o 2 ml.
 - Conservación: 4±3°C, liofilizado. Una vez resuspendido, alicuotar y conservar a <-10°C (fecha de caducidad: 18 meses).
- **CN:** Control negativo de referencia producido y suministrado por el CISA-INIA en viales liofilizados de 0,5 ml, 1 ml o 2 ml.
 - Conservación: 4±3°C, liofilizado. Una vez resuspendido, alicuotar y conservar a <-10°C (fecha de caducidad: 18 meses).

REACTIVOS NO INCLUIDOS EN EL KIT:

- **Acetona** [Ref. 1.00014.1000 (Merck) o características similares].
- **Acetato sódico tri-hidratado** [Ref.: 1.06267.0500 (Merck) o de similares características].
- **Ácido acético glacial** [Ref.: 141008.1611 (PANREAC) o características similares].
- **AEC (3-aminoetil-carbazol)** [Ref. SIGMA A6926 o características similares].
- **Agua destilada.**
- **Agua oxigenada 30% (H₂O₂).**
- **Células de riñón de mono (MS)** [ATCC/ECACC 91070510].
- **Células de riñón de mono (VERO)** (ATCC, CCL 81)
- **EMEM medio de cultivo células MS** [Ref. BioWhittaker BE12136K o características similares], Medio *Eagle* suplementado con 10% de suero de cerdo filtrado con filtros MiniSart (0,45 micras) y estéril [Ref. Sigma P-9783 o características similares], 1% de solución 100X de aminoácidos no esenciales [Ref. BioWhittaker BE13-114E o características similares], 1% glutamina [4mM] [Ref. BioWhittaker BE17-605E o características similares], y sulfato de gentamicina 50mg/ml [Ref. BioWhittaker 17-518Z o características similares].
- **DMEM medio de cultivo células VERO:** Dulbecco's Modified Eagle Medium con 4,5g/L Glucosa suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino [Ref.: 10106-169 (Gibco) o características similares], 1% aminoácidos no esenciales 100x [Ref.: BE13-114E (BioWhittaker) o características similares], 1% Piruvato sódico [Ref.: BE13-115E (BioWhittaker) o características similares] 1% glutamina [4mM] [Ref.: BE17-605E (BioWhittaker)] o características similares], nistatina [10.000 U/ml] [Ref.: 15340029 (Gibco) o características similares] y sulfato de gentamicina 50mg/ml [Ref.: 17-518Z (BioWhittaker) o características similares].

- **HRPO-Conjugado:** Proteína A peroxidasa 1mg/ml [REF. 0032400. PIERCE/ o características similares].
- **N,N-Dimetil formamida** [Ref.: 1.029370500 (Merck) o características similares]
- **Metanol** [Ref.: 1.06009.1000 (Merck) o características similares]
- **Tampón fosfato salino (PBS 1x) pH 7,2** (±0,2 U_{pH}) → El PBS puede adquirirse en tabletas [Ref.: 524650-1 (CALBIOCHEM) o de similares características] o puede prepararse de la siguiente manera:

CINa [Ref. 1.06404.1000 (MERCK) o de similares características]	8,0 gr (±0,1)
ClK [Ref. 1.04936.0500 (MERCK) o de similares características]	0,2 gr (±0,01)
PO ₄ H ₂ K [Ref. 1.04873.1000 (MERCK) o de similares características]	0,2 gr (±0,01)
PO ₄ HNa ₂ [Ref. 1.06586.0500 (MERCK) o de similares características]	1,15 gr (±0,05)
Agua destilada	1.000 ml

Conservar a Tª ambiente. Fecha de caducidad 1 año.

- **Leche en polvo.**
- **Tween-20** [Ref.: 8.22184.1000 (Merck) o de similares características].

5.2. PREPARACIÓN

5.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

La preparación de las muestras a analizar se realizará según se describe en el procedimiento de preparación de muestras para el diagnóstico de la peste porcina africana [PNT/CISA/PPA/MUESTRAS/1].

5.2.2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.

- **Preparación de los controles (CP, CL y CN):** resuspender los controles en agua destilada en la cantidad indicada en el vial. Una vez resuspendidos, alicuotar según las necesidades de uso y conservar a <-10°C hasta el momento de su utilización. Antes de añadir la IPT realizar una *dilución 1/80 en solución de bloqueo*.
- **Solución de bloqueo:** PBS/0,05%Tween 20, pH 7,2 (±0,2 U_{pH}) /leche 5% (preparar en el momento de uso).

CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE PPA REV. 2014	PNT/CISA/PPA/IPT/1
		Página 5 de 7

- **Solución de fijado de las placas;** solución fría de acetona 30%-metanol 70%. Conservar a $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- **Preparación del conjugado:** Resuspender en 200 μl de agua destilada. Una vez resuspendido, alicuotar según las necesidades de uso y conservar a $< -10^{\circ}\text{C}$. Antes de añadir a la IPT, realizar una *dilución 1/5000 en solución de bloqueo*.
- **Solución sustrato;** debe ser preparada en el momento de uso. Mezclar 300 μl de solución stock en 5ml de buffer acetato + 5 μl of H_2O_2 (volumen recomendado para una placa de 96 pocillos)
 - Solución stock (20 mg/ una tableta de AEC (3aminoetilcarbazon) en 2,5 ml de dimetilformamida. Conservar a $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. *Fecha de caducidad 1 mes.*
 - Buffer acetato 74 ml solución A+ 176 ml solución B. *Conservar a T° ambiente. Fecha de caducidad 6 meses.*
 - **Solution A;** 0,2N ácido acético glacial (1,155 ml de acético en 100ml de agua). *Conservar a T° ambiente. Fecha de caducidad 6 meses.*
 - **Solution B;** 0,2M acetato sódico (2,72_(±0,05) gr AcNa trihidratado en 100ml agua). *Conservar a T° ambiente. Fecha de caducidad 6 meses.*

5.3. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA.

1. **Infectar monocapa de células VERO o células MS 80%** confluentes con el aislado correspondiente del VPPA adaptado a cada tipo celular dejando un control de células sin inocular. Se inoculan las células a una m.o.i de 20 (dilución en medio con 2% de SFB).
2. Incubar a **$37 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 16-18 horas** en atmósfera de CO_2
3. **Fijar las células**
 - a. Retirando el sobrenadante por aspiración.
 - b. Añadir **50 μl /pocillo de la solución de fijado**.
 - c. Incubar **5-10 minutos** a T° ambiente (observar si el tapiz se despeg).
 - d. Lavar las células entre 15-20 minutos con PBS1x en agitación continua.

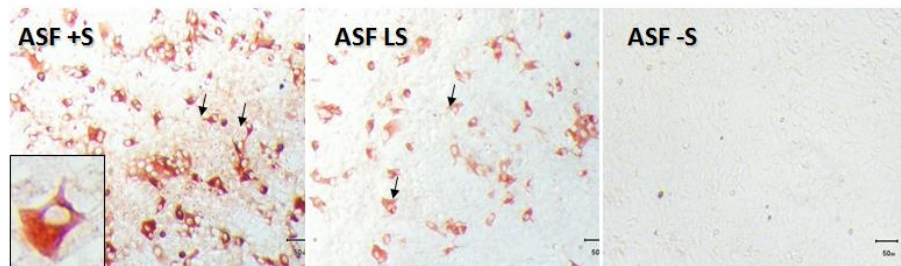
Las células inoculadas y ya fijadas se pueden congelar a $< -10^{\circ}\text{C}$. Fecha de caducidad: 12 meses.

4. Atemperar las placas ($18-25^{\circ}\text{C}$) **durante 30 minutos** antes de empezar con la IPT
5. Bloquear con **100 μl /pocillo** de la solución de bloqueo e incubar 1h a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en agitación.
6. Descartar la solución de bloqueo y **añadir los sueros problemas y los controles de referencia diluidos al 1/80 en solución de bloqueo**. Se recomienda incluir los controles por duplicado.
7. Incubar **45 minutos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$** en agitación.
8. **Lavar la placa** 3 veces añadiendo 200 μl /pocillo de PBS 1x 5 minutos cada vez a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en agitación.
9. Añadir **100 μl /pocillo** del **conjugado** diluido al **1/5000** en solución de bloqueo. Incubar 45 minutos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en agitación
10. **Lavar la placa** 3 veces añadiendo 200 μl /pocillo de PBS 1x 5 minutos cada vez a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en agitación
11. **Añadir 50 μl /pocillo de la solución sustrato** e incubar 5-10 minutos a temperatura ambiente ($18-25^{\circ}\text{C}$) o hasta que los pocillos con el CN empiecen a tener color.
12. Añadir **PBS 1x** para frenar la reacción.
13. **Leer los resultados en el microscopio.**

5.4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Al observar al microscopio, en los pocillos con las muestras positivas frente al VPPA, el Ac específico se habrá unido a las células infectadas con el virus formándose el complejo antígeno-anticuerpo que es revelado mediante la acción de la peroxidasa con el sustrato observándose una intensa coloración citoplasmática en las células infectadas

La coloración roja intracelular se interpreta como un resultado positivo a anticuerpos frente al VPPA y su ausencia como negativo.



5.5. PUNTOS CRÍTICOS

Sueros procedentes de explotaciones que han sido vacunados frente a otras enfermedades pueden dar lugar a un fondo inespecífico con coloración roja de los pocillos.

En estas situaciones se recomienda preincubar los sueros antes de añadirlos a la placa (paso 6 sección 5.3) con 5% de SFB durante 1h a 37 ± 2 °C en agitación.

5.6. MEDIDAS DE SEGURIDAD.

- Leer atentamente el protocolo.
- Conservar los reactivos a la temperatura indicada antes de su utilización.
- Evitar cualquier contaminación de los reactivos y de los cultivos celulares.
- No utilizar las placas una vez superada la fecha de caducidad.
- No comer, beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
- No pipetear los reactivos con la boca.
- Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
- Incluir sistemáticamente un CP, CL y CN.

Plantilla de resultados CISA/PPA/IPT/1

REGISTRO DE ENTRADA:

FECHA DEL ANÁLISIS:

TÉCNICO:

ASF-IPT placas LOTE:

CP LOTE:

CL LOTE:

CN LOTE:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

OBSERVACIONES: