

ANEXO II

ELISA PARA RVB

Este ELISA utilizado consiste en un ensayo doble sándwich, desarrollado a partir de la técnica descrita para bovinos (Fernández y col. 1996; 1998; Parreño y col, 2004). La técnica fue adaptada para detectar Ac IgG en suero de cobayos vacunados con vacunas utilizadas para la prevención de las diarreas neonatales que contengan RV. Se utiliza para detectar anticuerpos IgG anti rotavirus en suero de cobayos inmunizados con vacunas destinadas a prevenir las diarreas neonatales del ternero.

Brevemente, se sensibilizan placas de ELISA de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos con un suero hiperinmune anti-RVB obtenido en terneros descalostrados desafiados e hiperinmunizado con rotavirus bovino en buffer carbonato-bicarbonato pH: 9,6. Las placas se incuban durante 18 horas a 48°C y luego se bloquean con leche descremada. Posteriormente se agrega sobrenadante clarificado de cultivos de MA-104 infectados con RVB cepa IND (P[5]G6) con título viral no menor a 10^7 UFF/ml (pocillos positivos) o sobrenadante de células MA-104 sin infectar (pocillos negativos). A continuación se colocan las muestras a analizar en diluciones seriadas en base 4 a partir de una dilución de 1/16. Finalmente, se agregan un anticuerpo comercial anti-IgG de cobayo, marcado con peroxidada. La reacción se revela utilizando H₂O₂/0,05% ABTS como sistema sustrato/cromógeno y detenida con el agregado de 50 de SDS al 10%. La lectura de las placas se realiza a 405 nm.

Los resultados pueden interpretarse e informarse siempre que se haya dado conformidad al ensayo. Una muestra puede ser negativa, positiva o inespecífica. Pero en general el ensayo se utiliza para obtener el título de Ac IgG anti-RV el que se expresa como la inversa de la máxima dilución con lectura superior al punto de corte o “cut off” del ensayo.

ALCANCE Y OBJETIVOS

Este ELISA se ha diseñado para detectar Ac IgG (H+L) en sueros de cobayos vacunados con vacunas para la prevención de las diarreas neonatales, que contengan RV.

MATERIALES

- Placas para ELISA NUNC-inmuno plate-Maxisorp, cat.# 442404 o similar
- Tips amarillos (hasta 200 µl)
- Tips azules (hasta 1000 µl)
- Tips blancos Multistepper Multicanal (1000 µl).
- Cubetas descartables o reciclables autoclavables
- Cubeta descartable para ABTS (según lo indicado en el I 22-02-05 - Clasificación y Disposición de Residuos Especiales)
- Tubos cónicos de 15 y 50 ml
- Descarte
- Bolsas de autoclave verdes

- Papel absorbente
- Guantes descartables

EQUIPOS

- Micropipeta hasta 200µl (tolerancia máxima admitida: 5µl)
- Micropipeta hasta 20µl (tolerancia máxima admitida: 0.2µl)
- Micropipeta hasta 1000µl (tolerancia máxima admitida: 10 µl)
- Micropipeta multicanal 8-12 hasta 300µl. Sin restricciones respecto a la tolerancia.
- Micropipeta multistepper multicanal 8 hasta 300 µl. Sin restricciones respecto a la tolerancia.
- Estufa de 37°C con atmósfera controlada a 0,5% de CO₂.

Se admite para esta técnica una variabilidad en el rango de:

3. temperatura de la estufa: 0.5° C.

4. Porcentaje de CO₂: 0.1%.

- Lector de ELISA con filtro para lectura a 405 nm (rango: 400-410 nm)
- Microcentrífuga (hasta 14.000 rpm)
- Heladera 4-8°C
- Balanza digital hasta 200 g

REACTIVOS

- Buffer Coating (carbonato/bicarbonato) pH 9,6. (Tolerancia en pH: 0.03)

Na₂CO₃ 0,159 grs.

NaHCO₃ 0,293 grs.

Agua destilada c.s.p. 100 ml

Ajustar pH con NaOH/HCl I N

Almacenar a 4°C (1-8°C)

- Buffer Acido cítrico pH 5.0 (Tolerancia en pH: 0.03)

Acido Cítrico Monohidrato 0,960 grs.

NaOH IN aprox. 10 ml para llevar a pH 5,0

Ajustar a pH: $5,0 \pm 0,5$ con Na(OH) o HClIN.

Agua destilada c.s.p. 100 ml

Medir pH luego de agregarle el agua destilada. Ajustar nuevamente en caso de ser necesario.
Almacenar a 4°C ($1-8^{\circ}\text{C}$)

- ABTS Solución Madre

ABTS 0,22 grs.

Buffer Acido Cítrico 10 ml.

Fraccionar en alícuotas de 1 ml en tubos plásticos tipo “ependorf” de 1.5 ml.

Almacenar a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

- Solución de uso ABTS

(Preparar en el momento de uso sólo la cantidad necesaria y descartar el remanente).

Solución madre ABTS 300 μl

Buffer Acido cítrico 10ml

Agua oxigenada H₂O₂ 10 μL

- SDS (dodecil/laurel sulfato de sodio) al 5% en agua.

- Agua Oxigenada de TREINTA (30) volúmenes.

- Buffer de Lavado (PBS 1X Tween 0,05%)

PBS 1000ml

Tween 20 500 μL

- Buffer de bloqueo

Leche descremada en polvo 10 grs.

PBS / Tween 20 c.s.p. 100ml

- Captura suero hiperinmune de ternero descalostrado desafiado e hiperinmunizado con rotavirus (INTA).

ANTIGENOS

- Antígeno Positivo: suspensión de Rotavirus Bovino grupo A producido en células MA104 (INTA).

- Antígeno negativo: Células MA-104 MOCK (NO INFECTADAS O CONTROL NEGATIVO DE INFECCION)

CONJUGADO

- Ac conjugados con peroxidasa: Conjugado Anti IgG de Cobayo marcado con peroxidasa. Affinity purified goat anti- Guinea Pig Ig G (H+L) peroxidase labeled, KPL, cat # 14-17-06 o de otras marcas o productos internamente verificados/validados en INTA como óptimos para utilizarse en esta técnica.

CONTROLES

- Controles positivos: muestra de suero de cobayo ya titulados en ensayos previos y que presentan un título conocido probado al menos en CINCO (5) ensayos. Estos sueros se obtiene a partir de animales vacunados con vacuna de RVB de referencia.
- Controles negativos: suero normal de cobayo diluido 1 en 4.

Se corren los controles que correspondan en TODAS las placas de un ensayo, según el tipo de muestras a ensayar.

Sueros Estándares positivos y negativos: sueros de título conocido que se corren intercalados entre las muestras.

- PBS (Blanco de reactivos). Se corre en TODAS las placas de un ensayo.

PREPARACION DE MUESTRAS

Sueros:

No necesitan preparación previa, sólo que estén totalmente descongelados y homogeneizados.

PROCEDIMIENTO DEL ELISA

1. Sensibilización de la placa

Preparar el volumen necesario de Captura positiva: según la cantidad de placas a utilizar y el la dilución de trabajo del lote de suero en uso. Se necesitan 10ml de del dilución de trabajo de la captura positiva por placa de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos.

Colocar 100 µL/ pocillo, en todas las placas de reacción

Incubación: ON 18 ± 2 hs a 4-8°C

- Descartar el contenido de la placa.
- Lavar la placa 1 vez con PBS/Tween20 0.05%
- Secar golpeando la placa contra un papel absorbente.

2. Bloqueo

Leche Descremada 10% en PBS/ Tween 20 0.05%

Colocar 100 µL/pocillo

Incubación: 1 hs 37°C

A partir de este paso, si no se cuenta con estufa con atmósfera de CO₂ las incubaciones se pueden realizar a 37°C en una cámara húmeda (recipiente plástico con tapa donde se coloca una servilleta de papel humedecido con agua destilada).

- Descartar el contenido de la placa.
- Lavar la placa 2 veces con PBS/Tween 20 0.05%
- Secar golpeando la placa contra un papel absorbente.

3. Antígenos

- Realizar la dilución de trabajo del Antígeno Positivo (Lote de Rotavirus bovino para ELISA) en PBS/Tween20 0.05%
 - Diluir el Ag Negativo (MA-104 Mock) en la misma dilución que el Ag positivo, en PBS/Tween20 0.05%.
-

Se necesitan 5ml de Ag+ y 5 ml de Ag por placa de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos

- Colocar 100µl de Ag positivo en las columnas impares
 - Colocar 100µl de Ag negativo en las columnas pares
 - Incubación: 1 hs 37°C
 - Descartar el contenido de la placa.
 - Lavar la placa 4 veces con PBS/Tween20 0,05%.
 - Secar golpeando la placa contra un papel absorbente
-

NOTA: Si las placas no se usan en el momento, después de los lavados, se almacenan a -20°C (± 2°C) hasta su momento de uso.

4. Muestras

NOTA: En cada placa del ensayo incluir: Blanco de reactivos: PBS/Tween20 0.05%, 4 diluciones de un control positivo y dos pocillos con la dilución 1/4 de un control negativo. Incluir en el ensayo en forma aleatoria en alguna de las placas estándares positivos de título conocido y estándares

negativos.

Diseño de placa:

| Placa Nº | Captura positiva: suero policlonal anti RVB | | | | | | | | | | | | |
|----------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | virus | | mock | | virus | | mock | | virus | | mock | | |
| Mtra+diluyente | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| 50ul +150ul | Mtra1 | | Mtra2 | Mtra2 | Mtra3 | Mtra3 | Mtra4 | Mtra4 | Mtra5 | Mtra5 | Ctrol+ | Ctrol+ | 1/16 |
| A | | Mtra1 | | | | | | | | | | | |
| 50ul+150ul | | | | | | | | | | | | | 1/64 |
| B | | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | | 1/256 |
| D | | | | | | | | | | | | | 1/1024 |
| E | Mtra6 | Mtra6 | STD+ | STD+ | Mtra8 | Mtra8 | Mtra9 | Mtra9 | Mtra10 | Mtra10 | Ctrol- | Ctrol- | 1/16 |
| F | | | | | | | | | | | Ctrol- | Ctrol- | 1/16 |
| G | | | | | | | | | | | PBS | PBS | |
| H | | | | | | | | | | | PBS | PBS | |

Realizar las diluciones en placas sustitutas (placas de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos de cultivo, limpias, no estériles)

- Cargar 150µl de PBS/Tween en todos los pocillos y cargar en la primera fila el volumen de muestra o su dilución previa

Ejemplos: 50µl de muestra pura (dil inicial 1/4); o 50µL de una dilución previa 1/16 (dil inicial 1/64) 10µl de muestra pura (dil. inicial 1/16); o 10µL de una dilución previa 1/16 (dil inicial 1/256)

- Traspasar 50µl de fila en fila (así se obtienen diluciones base 4)
- Una vez finalizadas las diluciones, traspasar 100µl/pocillo a la placa de reacción, comenzando desde la dilución más diluida a la más concentrada.
- Descartar las placas sustitutas y colocar las placas de reacción en la estufa
- Incubar la placa de 1 h a 37°C, en 5% CO2.
- Descartar el contenido de la placa.
- Lavar la placa 4 veces con PBS/Tween 0.05%.
- Secar golpeando la placa contra un papel absorbente.

5. Conjugado

Realizar la dilución de trabajo del conjugado - anti-IgG (H+L) cobayo. Colocar 100µl del conjugado en todos los pocillos.

Se necesitan 10ml de dilución de trabajo de conjugado por placa de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos

- Incubar la placa una hora a 37°C, en 5% CO₂.
- Descartar el contenido de la placa.
- Lavar la placa 4 veces con PBS/Tween 0.05%.
- Secar golpeando la placa contra un papel absorbente.

6. Revelado

Preparar: Solución de uso ABTS

Sol. Madre 300µl

Buffer ácido cítrico 10ml

Agua oxigenada 10µL.

Se necesitan 10ml de Solución de Revelado por placa de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos

Se puede reemplazar por reactivos comerciales listo para usar

- Colocar 100µL en cada pocillo
- Dejar reaccionar en oscuridad, revisar las placas cada 2-3 minutos, realizar lecturas previas y cortar cuando el control positivo y los estándares positivos hayan alcanzado el título esperado.
- Cortar la reacción con 50 µL de SDS al 5%

7. Lectura y cálculos

LECTURA

- Leer las placas a 405 nm en un Lector de ELISA.

CALCULOS

o Calcular la Densidad óptica (DO) corregida de cada muestra (DO cap positiva - DO de cap negativa).

o Calcular el promedio y el desvío de la ODc los controles negativos

o Calcular el Cut off de la placa: promedio de los controles negativos + 2 STD, en general este valor

no debe superar un valor de 0.100. Se toma como positivas a las muestras que cuya ODc superan un valor de corte del ensayo establecido en una DOc = 0.100 ± 0.050 .

8. Aceptación del ensayo (conformidad)

El ensayo se considera conforme cuando el título del control positivo, alcanza su título esperado, el negativo se mantiene negativo DO y la DOc del blanco de reactivo no supera el valor 0.100.

Una muestra se considera:

Positiva: Si su DOc es mayor al cut off de la placa.

Negativa: Si su DOc es menor al cut off de la placa.

Inespecífica: Si su DO en virus y mock es elevada. Es decir la muestra presenta un color intenso en ambas capturas. En este caso se recomienda volver a ensayar la muestra previa adsorción con suspensión de células MA-104. Si el problema persiste el título de Ac no puede definirse por esta técnica.

9. Informe de resultados

El título de Ac de una muestra se establece como la inversa de la máxima dilución cuya DOc sea mayor al cut off de la placa, (cut off=0.100).

Se informa el título de Ac anti-RVB detectado como el log en base 10 de la inversa de la máxima dilución cuyo DOc resulte mayor al punto de corte del ensayo (cut off=0.100)

Las muestras negativas en la mínima dilución de suero ensayada (1/16) se expresan con un título arbitrario de 0.3 para los cálculos.

10. APROBACION DE LA PRUEBA DE POTENCIA EN COBAYO SEGUN ESTA TECNICA:

Se evaluarán todos los sueros de los animales inmunizados con la vacuna en control. Se seleccionarán CINCO (5) de los sueros con mayor título obtenido y sobre ellos se realizará el promedio. Para la APROBACION de la vacuna sometida a control, el promedio de los títulos deberá ser mayor o igual a 1.96 por la técnica de ELISA para RVB.