

SECCIÓN 2.8.

SUIDAE

CAPÍTULO 2.8.1.

PESTE PORCINA AFRICANA

RESUMEN

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad infecciosa de los cerdos domésticos y salvajes de todas las razas y edades causada por un virus que produce diversos síndromes. La enfermedad aguda se caracteriza por fiebre elevada, hemorragias en el sistema reticuloendotelial y mortalidad alta. Se ha observado que determinadas garrapatas blandas del género Ornithodoros, en concreto O. moubata y O. erraticus, son reservorios y vectores de transmisión del virus de la PPA (VPPA).

El VPPA es el único miembro de la familia Asfarviridae, género Asfivirus.

Los procedimientos de laboratorio para el diagnóstico se clasifican en dos grupos: el primero incluye pruebas para aislar el virus y la detección de los antígenos víricos, así como el ADN genómico, y el segundo contiene pruebas para detectar anticuerpos. La elección de las pruebas que se han de realizar en función de la situación de la enfermedad y de la capacidad de diagnóstico del laboratorio en la zona o país.

Identificación del agente: *El diagnóstico de laboratorio debe enfocarse al aislamiento del virus, realizando en paralelo una inoculación de leucocitos de cerdo o cultivos de médula ósea, la detección del antígeno en hisopos o cortes de tejidos congelados por la prueba de la inmunofluorescencia directa (FAT) y la detección del ADN genómico por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es una técnica excelente, muy sensible y rápida para la detección del VPPA y es muy útil en muchas circunstancias. Es especialmente útil si los tejidos no son los apropiados para el aislamiento del virus y la detección del antígeno.*

En casos dudosos, el material se pasa en cultivos celulares de leucocitos y se repiten los procedimientos descritos anteriormente.

Pruebas serológicas: *Los cerdos que sobreviven a la infección natural generalmente desarrollan anticuerpos contra VPPA 7–10 días después de la infección, y estos anticuerpos persisten durante largos períodos de tiempo. Cuando la enfermedad es endémica o cuando un brote inicial está causado por una cepa de baja virulencia, la investigación de nuevos brotes debe incluir la detección de anticuerpos específicos en el suero o en los extractos de los tejidos enviados. Para la detección de anticuerpos se dispone de varios métodos, como la inmunofluorescencia indirecta (IFA), el enzoinmunoanálisis (ELISA) y la prueba de inmunotransferencia.*

Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico: *Actualmente no existe vacuna para la PPA.*

A. INTRODUCCIÓN

El virus de la peste porcina africana (VPPA) es un virus grande de ADN con envoltura, icosaédrico y complejo que exhibe muchos rasgos comunes tanto a la familia de los Iridovirus como a la familia de los Poxvirus (Arias & Sánchez-Vizcaíno, 2002a; Vinuela, 1985). Actualmente se clasifica al virus como el único miembro de una familia llamada *Asfarviridae* (Dixon *et al.*, 2005). Se han identificado al menos 28 proteínas estructurales en partículas de

virus intracelulares (200 nm) (Sánchez-Vizcaíno, 2006). Se han identificado más de 100 proteínas infecciosas en macrófagos porcinos infectados, y al menos 50 de ellas reaccionan con sueros de cerdos infectados o convalecientes. El genoma del virus comprende entre 170 y 192 kilobases (kb), con una región central conservada de unas 125 kb y terminaciones variables. Estas regiones variables codifican 5 familias de multigenes que están directamente implicados en la variabilidad del genoma del virus (Blasco *et al.*, 1989). Se ha llevado a cabo el análisis completo de la secuencia de varias cepas de VPPA (Chapman *et al.*, 2008; De Villier *et al.*, 2010). Diferentes cepas de VPPA difieren en su capacidad para causar enfermedad, pero actualmente sólo hay un serotipo reconocido del virus detectable mediante las pruebas de anticuerpos.

La epidemiología molecular de la enfermedad se investiga por secuenciación del extremo C terminal del gen que codifica la proteína VP72, que diferencia hasta 22 genotipos distintos (Boshoff *et al.*, 2007; Lubisi *et al.*, 2005). Se ha confirmado la secuencia del genoma completo del gen *p54* como método útil adicional de genotipificación para estudios epidemiológicos a nivel molecular (Gallardo *et al.*, 2009). Se obtiene una mejora de la discriminación mediante el análisis de la región central variable (CVR) dentro del gen B602L, descrita como el locus más variable para distinguir entre cepas estrechamente emparentadas e identificar subgrupos de virus en varios de los 22 genotipos (Gallardo *et al.*, 2009).

Los virus de la PPA producen una serie de síndromes que oscilan entre la enfermedad sobreaguda y aguda a la crónica, así como portadores del virus aparentemente sanos. Los cerdos son la única especie de animales domésticos que resulta infectada de forma natural por el VPPA. Los jabalíes y los cerdos salvajes también son susceptibles a esta enfermedad, mostrando signos clínicos y tasas de mortalidad similares a las observadas en cerdos domésticos. Por el contrario, los cerdos salvajes de África, tales como el jabalí africano facóquero (*Phacochoerus aethiopicus*), el potamoquero (*Potamochoerus porcus*) y el cerdo gigante de bosque (*Hylochoerus meinertzhageni*), son resistentes a la enfermedad y muestran pocos o ningún signo clínico. Estas especies de cerdos salvajes actúan como reservorios del VPPA en África (Sánchez-Vizcaíno, 2006).

El período de incubación en la naturaleza es, por lo general, de 4-19 días. Las cepas más virulentas producen una enfermedad hemorrágica sobreaguda o aguda caracterizada por fiebre elevada, pérdida de apetito, hemorragias cutáneas y de los órganos internos, y muerte a los 4–10 días, algunas veces incluso antes de que se observen los primeros signos clínicos. Las tasas de mortalidad pueden alcanzar el 100%. Las cepas menos virulentas producen signos clínicos leves – fiebre ligera, reducción del apetito y decaimiento – que pueden confundirse fácilmente con muchos otros trastornos de los cerdos y no llevar a la sospecha de PPA. Las cepas avirulentas y no hemadsorbentes ocasionalmente producen principalmente una infección subclínica no hemorrágica y seroconversión, pero algunos animales pueden desarrollar lesiones delimitadas en los pulmones o en la piel en áreas con salientes óseos y otras zonas susceptibles a los traumatismos. Los animales que se han recuperado de infecciones agudas o crónicas pueden quedar infectados de forma persistente y actuar como portadores del virus. Aún no se comprende muy bien la base biológica de la persistencia del VPPA. (Carrillo *et al.*, 1994). Los cerdos portadores del VPPA recuperados y los cerdos salvajes infectados de forma persistente constituyen el mayor problema para el control de la enfermedad. El diagnóstico serológico de los cerdos portadores ha sido vital para el éxito de los programas de erradicación (Arias & Sánchez-Vizcaíno, 2002).

La PPA no puede distinguirse de la peste porcina clásica (PPC) (cólera del cerdo) ni mediante la exploración física y mediante el examen postmortem, y ambas enfermedades deben tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial de cualquier síndrome febril agudo y hemorrágico en el cerdo. Las septicemias bacterianas también pueden confundirse con la PPA y la PPC. Para distinguir entre estas enfermedades son esenciales las pruebas de laboratorio.

En países libres de PPA donde se sospecha su presencia, el diagnóstico de laboratorio debe dirigirse al aislamiento del virus realizando en paralelo una inoculación de leucocitos de cerdo o cultivos de médula ósea, y a la detección del antígeno en hisopos o cortes de tejidos congelados por la prueba de la inmunofluorescencia directa (FAT) y por la detección del ADN genómico, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es la técnica más sensible para detectar la presencia del agente etiológico en animales infectados crónicos y es particularmente útil si debido a la putrefacción las muestras de las que se dispone son inadecuadas para aislar el virus o para detectar el antígeno. El VPPA puede detectarse mediante la PCR desde estadios muy tempranos de la infección en tejidos, en muestras de sangre y suero tomadas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los cerdos recuperados de infecciones agudas o crónicas, generalmente exhiben una viremia durante varias semanas, haciendo de la PCR una herramienta muy útil para la detección de ADN del VPPA en cerdos infectados con cepas de virulencia baja o moderada.

Dado que no existen vacunas disponibles, la presencia de anticuerpos del VPPA es indicativa de una infección previa y, como los anticuerpos se producen desde la primera semana de la infección y persisten durante largos períodos, constituyen unos buenos marcadores para el diagnóstico de la enfermedad. La aparición temprana (a los 7–10 días después de la infección) y la subsiguiente persistencia a largo plazo de los anticuerpos, hacen que las técnicas de detección de anticuerpos, tales como el ELISA, la inmunotransferencia o la IFA sean muy útiles en el diagnóstico de las formas subaguda y crónica de la enfermedad.

Desde el punto de vista de la epidemiología, la PPA es compleja, con patrones de infección en África y Europa. La PPA tiene lugar por ciclos de transmisión en los que intervienen cerdos domésticos, jabalíes, suidos africanos salvajes y garrapatas blandas (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2009). En regiones donde están presentes las garrapatas blandas *Ornithodoros*, la detección del VPPA en estos reservorios de la infección contribuye a un mejor entendimiento de la epidemiología de la enfermedad. Esto es muy importante para establecer programas de control y de erradicación eficaces (Basto *et al.*, 2006).

La PPA no es una enfermedad zoonótica y no afecta a la salud pública (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2009).

El VPPA debe manipularse en laboratorios que hayan sido aprobados por las Autoridades Competentes siguiendo las directrices de la OIE para la biocontención de agentes patógenos del Grupo 3 y 4.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

Cuando se sospecha de PPA, se deben enviar al laboratorio las siguientes muestras: sangre con anticoagulante (EDTA), bazo, ganglios linfáticos, amígdalas, y riñón. Durante el transporte, estas muestras deben mantenerse tan frías como sea posible, pero sin congelarlas. Cuando llegan al laboratorio, si el proceso de análisis se retrasa, se guardan a -70°C . Como no siempre es posible mantener la cadena de frío, se pueden enviar las muestras en solución salina con glicerol; esto puede reducir ligeramente la probabilidad de aislar el virus, pero podría facilitar la llegada de los envíos al laboratorio para poder confirmar un brote.

1.1. Preparación de muestras para la prueba de la hemadsorción

- i) Se preparan suspensiones de los tejidos triturando pequeños trozos de 0,5–1,0 g en un mortero con arena estéril y añadiendo 5–10 ml de una solución salina tamponada o medio de cultivo de tejidos que contenga antibióticos.
- ii) Se clarifican las suspensiones mediante una centrifugación a 1.000 **g** durante 5 minutos. Se utiliza el sobrenadante para el cultivo celular/hemadsorción (apartado B.1.2 más adelante).

1.2. Prueba de la hemadsorción

La prueba de la hemadsorción (HAD) (Malmquist & Hay, 1960) está basada en el hecho de que los eritrocitos porcinos se adhieren a la superficie de los monocitos o macrófagos porcinos que están infectados por el VPPA, y que la mayoría de cepas del virus producen este fenómeno de hemadsorción. Un resultado positivo en las pruebas HAD es definitivo para el diagnóstico de la PPA. Se ha aislado un pequeño número de virus “no hemadsorbentes”, en gran parte avirulentos, aunque algunos producen PPA aguda típica. La prueba se realiza inoculando sangre o una suspensión de tejidos de animales sospechosos a cultivos primarios de leucocitos (Procedimiento 1) o en cultivos celulares de macrófagos alveolares, y también preparando cultivos de leucocitos de la sangre de cerdos inoculados en el laboratorio o de cerdos sospechosos en el campo (Procedimiento 2, abajo). Se pueden preparar hasta 300 cultivos en tubos a partir de cada 100 ml de sangre desfibrinada recogida. Resulta esencial realizar los procedimientos de forma que se evite la contaminación de los cultivos.

1.2.1. Procedimiento 1: Prueba de la hemadsorción en cultivos primarios de leucocitos

- i) Se recoge el volumen necesario de sangre de cerdo fresca desfibrinada.
- ii) Se centrifuga a 700 **g** durante 30 minutos y se recogen las células de la capa leucocitaria. Se añaden 3 volúmenes de cloruro de amonio al 0,83% a los leucocitos obtenidos. Se mezcla e incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifuga a 650 **g** durante 15 minutos y se retira cuidadosamente el sobrenadante. Se lava el sedimento en un medio o en solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- iii) Se resuspenden las células a una concentración de 10^6 – 10^7 células/ml en un medio de cultivo de tejidos que contenga un 10–30% de suero porcino y antibióticos. Para evitar la hemadsorción inespecífica, el medio debe contener suero o plasma del mismo cerdo del que se obtienen los leucocitos. Si se analiza un gran volumen de muestras, los sueros homólogos pueden reemplazarse por un suero que se haya identificado como capaz de evitar la formación de auto-rosetas inespecíficas en un pre-análisis.
- iv) Se distribuye la suspensión celular en placas de 96 pocillos con 200 μl por pocillos (300.000 células/pocillo) y se incuba a 37°C en una incubadora humidificada y con un 5%

de CO₂. Este procedimiento también se puede realizar en alícuotas de 1,5 ml en tubos de 160 x 16 mm, que se incuban inclinados (5–10° respecto a la horizontal) a 37°C.

Nota: Para el diagnóstico rutinario, solo los cultivos de 2–4 días son lo bastante sensibles.

- v) Pasados 3 días, se inoculan tres tubos o placas de pocillos añadiendo 0,2 ml/tubo o 0,02 ml (dilución final de 1/10)/por pocillo de muestras preparadas. Se aconseja inocular en los cultivos diluciones 1/10 y 1/100, y esto es particularmente importante cuando el material procedente del campo se encuentra en malas condiciones.
- vi) Se inoculan cultivos control positivos con virus hemadsorbente. Son esenciales los controles negativos no inoculados para controlar la posibilidad de hemadsorción inespecífica.
- vii) Se añade a cada tubo 0,2 ml de una preparación reciente de eritrocitos de cerdo al 1% en solución salina tamponada. En el caso de las placas de 96 pocillos, se añaden 0,02 ml de eritrocitos de cerdo al 1% por pocillo.
- viii) Se examinan diariamente al microscopio los cultivos durante 7–10 días para comprobar si presentan efecto citopático (ECP) y hemadsorción.
- ix) Lectura de los resultados

La hemadsorción consiste en la unión de muchos eritrocitos porcinos a la superficie de las células infectadas. En ausencia de hemadsorción, un ECP basado en la reducción del número de células adherentes puede deberse a citotoxicidad del inóculo, al virus de la enfermedad de Aujeszky o a VPPA no hemadsorbente, lo cual puede detectarse mediante FAT en el sedimento celular o mediante la PCR (véase más adelante). Si no se observa cambio, o si los resultados de la inmunofluorescencia o de PCR son negativos, el sobrenadante se vuelve a inocular hasta 3 veces en cultivos nuevos de leucocitos. Todas las cepas deben confirmarse por PCR y secuenciación.

1.2.2. Procedimiento 2: Prueba de la hemadsorción en auto-rosetas con leucocitos de sangre periférica de cerdos infectados

Este procedimiento es más rápido que la preparación e inoculación de cultivos primarios de leucocitos porcinos (descrita antes en el Procedimiento 1) y en casos positivos proporciona resultados más rápidos. Se puede realizar en laboratorios no equipados para análisis víricos; los requisitos mínimos son portas y cubres, un microscopio, medio estéril, tubos o frascos y pipetas. La sangre procedente de cerdos sospechosos en el campo o de cerdos inoculados en el laboratorio, se recoge con heparina y se preparan los cultivos de leucocitos para examen directo en busca de hemadsorción. No obstante, los resultados de la prueba son difíciles de estimar y el método está siendo sustituido por la PCR.

- i) Se recogen 20 ml de sangre completa en una jeringuilla que contenga 2.000 UI de heparina en 2 ml de solución salina, se mezclan y se transfieren a un tubo de vidrio o a un frasco estrecho.
- ii) Se coloca el tubo o frasco verticalmente en una incubadora o en un baño María a 37°C y se dejan sedimentar las células. La sedimentación se favorece añadiendo 2 ml de un expansor del volumen del plasma, como el "Dextravan 150" que es una solución inyectable de Dextrano 150 en NaCl al 0,9% (Fisons, Reino Unido).
- iii) Se incuban los cultivos durante 6–8 horas a 37°C y se examinan cada 2–3 horas pasando a un porta pequeñas alícuotas del sobrenadante enriquecido en leucocitos, junto con algunos eritrocitos.
- iv) Lectura de resultados

La presencia de células hemadsorbentes identificadas con un microscopio indican la presencia del VPPA. La hemadsorción consiste en la unión de muchos eritrocitos porcinos a la superficie de las células infectadas. Cualquier evidencia de hemadsorción sería suficiente para plantearse la repetición de la prueba o la confirmación la presencia del VPPA por medio de otra prueba, como la PCR.

1.3. Detección de antígeno mediante la prueba de la inmunofluorescencia

Se puede utilizar FAT (Bool *et al.*, 1969) como un método adicional para detectar antígeno en tejidos de cerdos sospechosos en el campo o inoculados en el laboratorio. La FAT positiva, junto con signos clínicos y lesiones compatibles, puede proporcionar un diagnóstico provisional de la PPA. También puede emplearse para detectar el antígeno del VPPA en cultivos de leucocitos donde no se ha

observado HAD y poder así identificar cepas no hemadsorbentes de virus. También distingue entre el ECP producido por VPPA y por otros virus, como el virus de la enfermedad de Aujeszky o por un inóculo citotóxico. Sin embargo, es importante observar que, en enfermedades subagudas y crónicas, la FAT tiene una sensibilidad muy reducida. Esta reducción en la sensibilidad puede estar relacionada con la formación de complejos antígeno-anticuerpo en los tejidos de los cerdos infectados que bloquean la interacción entre el antígeno del VPPA y el conjugado de la PPA (Sánchez-Vizcaíno, 2006).

1.3.1. Procedimiento analítico

- i) Se preparan cortes congelados o frotis por impronta de tejidos problema, o se extiende el sedimento celular de los cultivos de leucocitos inactivados en portas, se secan al aire y se fijan con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- ii) Se tiñen con inmunoglobulina anti-VPPA conjugada con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) a la dilución recomendada o pre-titulada, durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda.
- iii) Se fijan y tiñen preparaciones control positivas y negativas de forma similar.
- iv) Se lavan por inmersión cuatro veces en PBS fresco y aséptico, se montan los tejidos teñidos en PBS/glicerol, y se examinan al microscopio de luz ultravioleta con protección adecuada y filtros de excitación.
- v) Lectura de los resultados

Los tejidos son positivos si se observa una fluorescencia granular específica y citoplásmica en el tejido paracortical de órganos linfoides o en los macrófagos fijados en otros órganos, o en cultivos de leucocitos inoculados.

1.4. Detección del genoma vírico por la reacción en cadena de la polimerasa

Se han desarrollado técnicas de PCR utilizando cebadores de una región muy conservada del genoma para detectar e identificar una amplia gama de cepas pertenecientes a todos los genotipos víricos conocidos, incluyendo virus no hemadsorbentes y cepas de baja virulencia. Las técnicas de la PCR son particularmente útiles para identificar ADN vírico en tejidos de cerdos que son inadecuados para el aislamiento de virus o la detección de antígeno debido a que han sufrido putrefacción o cuando hay buenas razones para sospechar que el virus puede haberse inactivado antes de que las muestras hayan llegado al laboratorio.

Se describen dos métodos validados de PCR que consisten en un procedimiento de preparación de la muestra seguido del procedimiento analítico. Estos procedimientos sirven de modelo general y como punto de partida para protocolos de PCR. Las condiciones óptimas de reacción (tiempos de incubación y temperatura, modelos y suministradores de equipos, concentraciones de los reactivos para la prueba, como cebadores y dNTPs) pueden variar, de modo que primero deben comprobarse las condiciones descritas.

1.4.1. Procedimiento 2 de preparación de la muestra (Agüero *et al.*, 2003; 2004)

A continuación se describe un procedimiento de extracción en el que se utiliza el kit comercial High Pure PCR Template Preparation¹. Existen otros kits de extracción de ADN para la preparación del molde apropiado para la PCR dependiendo de la muestra que se vaya a analizar, y pueden ser adecuados para su uso. En este procedimiento se pueden utilizar diferentes muestras, tales como sobrenadantes de cultivo celular, sangre con EDTA, suero y tejidos homogeneizados, incluso si estos últimos se han guardado en condiciones de calor y presentan putrefacción. Este procedimiento tiene la ventaja de que puede ser utilizado tanto para la extracción del ADN del VPPA como para la del ARN del VPPC (virus de la peste porcina clásica), lo cual permite la detección simultánea de ambos virus mediante una PCR múltiple (Agüero *et al.*, 2004).

El kit High Pure PCR Template Preparation¹ (Preparación de Molde de Gran Pureza para la PCR) incluye los siguientes reactivos: tampón de unión, proteinasa K, tampón de extracción del inhibidor, tampón de lavado, tubos de filtro de gran pureza y tubos de recogida.

Para los órganos y las muestras de tejidos se debe preparar primero un homogenado del material al 1/10 en PBS y centrifugar después a 12.000 **g** durante 5 minutos. Se extrae el

1 Roche Diagnostics.

ADN/ARN del líquido sobrenadante resultante. Algunas veces es recomendable procesar una dilución de sobrenadante al 1/10 en paralelo.

Extracción para muestras control: en cada ciclo de extracción de ácido nucleico debe incluirse al menos un control positivo y uno negativo. Las muestras de control positivo deben ser 200 µl de suero, sangre en EDTA u homogenados de tejido al 1/10 (el mismo tipo de tejido que el de las muestras problema) positivos al VPPA: el control negativo debe consistir en 200 µl de agua o sangre en EDTA u homogenado de tejido negativos al VPPA. Se procesan ambos controles paralelamente a las muestras problema.

1.4.2. Preparación de las soluciones de trabajo

- i) **Proteinasa K liofilizada**
Se disuelve proteinasa K en 4,5 ml de agua destilada estéril, y se preparan alícuotas de la solución en viales de 500 µl. Se guardan a -20°C hasta que se utilizan.
- ii) **Tampón de extracción de inhibidor**
Se añaden 20 ml de etanol absoluto al vial original. Se etiqueta la botella y se anota la fecha correspondiente.
- iii) **Tampón de lavado**
Se añaden 80 ml de etanol absoluto al vial original. Se etiqueta la botella y se anota la fecha correspondiente.

1.4.2.1. Método de preparación

- i) Se pipetea 200 µl de la muestra en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- ii) Se añaden 200 µl de tampón de unión y 40 µl de proteinasa K. Se mezclan inmediatamente. Se incuban durante 10 minutos a 72°C.
- iii) Se centrifuga el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml brevemente para quitar las gotas del interior de la tapa.
- iv) Se añaden 100 µl de isopropanol al tubo de muestra.
- v) Se coloca el tubo de filtro de gran pureza [High Pure] en un tubo de recogida y se pipetea la muestra en el reservorio superior. Se centrifuga durante 1 minuto a 8.000 rpm. (Con muestras de sangre, se repite el paso de la centrifugación si queda muestra en el tubo de filtro).
- vi) Se desecha el tubo de recogida y se coloca el tubo de filtro dentro de un tubo de recogida limpio.
- vii) Se añaden 500 µl de tampón de extracción de inhibidor al reservorio superior y se centrifuga durante 1 minuto a 8.000 rpm.
- viii) Se desecha el tubo de recogida y se coloca el tubo de filtro dentro de un tubo de recogida limpio.
- ix) Se añaden 450 µl de tampón de lavado al reservorio superior y se centrifuga durante 1 minuto a 8.000 rpm.
- x) Se desecha el tubo de recogida y se repite el paso del lavado.
- xi) Se desecha el tubo de recogida y se coloca el tubo de filtro dentro de un tubo de recogida limpio. Se centrifuga durante 10 minutos a 13.000 rpm. para retirar el agua residual del tampón.
- xii) Se desecha el tubo de recogida y se coloca el tubo de filtro en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml.
- xiii) Para la elución de los ácidos nucleicos, se añaden 50 µl de agua esterilizada precalentada (70°C) al reservorio superior (se tendrá cuidado de no utilizar el tampón de elución incluido en el equipo para extracción del ARN del VPPC). Se centrifuga durante 1 minuto a 8.000 rpm.
- xiv) Se utiliza de inmediato o se almacena a -20°C para su uso posterior.

1.4.3. Amplificación por PCR mediante PCR convencional (Agüero *et al.*, 2003)

El conjunto de cebadores del VPPA descrito en este procedimiento puede combinarse con un conjunto de cebadores específico para el VPPC en un método de RT-PCR múltiple que permite la detección simultánea y diferenciada de ambos genomas del virus en una única reacción (Agüero *et al.*, 2004).

1.4.4. Soluciones reserva

- i) Agua estéril sin nucleasa.
- ii) Puede comprarse ADN polimerasa de arranque en caliente Taq Gold, Tampón II para PCR 10x, y cloruro de magnesio.
- iii) Puede comprarse también la mezcla de nucleótidos para PCR, que contiene cada una de las dNTP a una concentración de 10 mM.
- iv) Cebadores a una concentración 20 pmoles/ μ l: Secuencia del Cebador 1, 5'-AGT-TAT-GGG-AAA-CCC-GAC-CC-3' (cebador directo); Secuencia del Cebador 2, 5'- CCC-TGA-ATC-GGA-GCA-TCC-T-3' (cebador inverso).
- v) Tampón de carga 10x
Xileno cianol al 0, 2%, azul de bromofenol al 0,2 %, glicerol al 30%.
- vi) Tampón TAE (50x) para el gel de agarosa
Tris base (242 g); ácido acético glacial (57,1 ml); EDTA 0,5 M, pH 8,0 (100 ml); agua destilada (hasta 1 litro).
- vii) ADN marcador
Existe un marcador comercializado de 100 pares de bases.

1.4.4.1. Método de preparación

- i) Se prepara para cada muestra la mezcla de reacción para PCR que se describe más adelante, en un tubo estéril de microcentrifuga de 1,5 ml. Se prepara la mezcla de reacción de una sola vez, teniendo en cuenta el número de muestras a analizar y se cuenta como mínimo una muestra adicional.
- ii) Agua estéril o libre de nucleasa (17,375 μ l), tampón II para PCR 10x (2,5 μ l), cloruro magnésico 25 mM (2 μ l), mezcla dNTP cada una a una concentración de 10 mM (0,5 μ l), cebador PPA-1, 20 pmol/ μ l (0,25 μ l), cebador PPA-2, 20 pmol/ μ l (0,25 μ l), 5U/ μ l de ADN polimerasa Taq Gold (0,125 μ l).
- iii) Se añaden 23 μ l de mezcla de reacción de PCR al número necesario de tubos de PCR de 0,2 ml.
- iv) Se añaden 2 μ l del molde de la muestra extraída a cada tubo de PCR. Se incluye un control de reacción positivo (2 μ l del ADN del VPPA) y un control de reacción negativo (2 μ l de agua destilada) para cada ejecución de la PCR.
- v) Se colocan todos los tubos en un termociclador automático y se desarrolla el siguiente programa:
Un ciclo a 95°C durante 10 minutos.
40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos.
Un ciclo a 72°C durante 7 minutos.
Se mantiene a 4°C.
- vi) Al finalizar el programa, se retiran los tubos de PCR y se añaden 2,5 μ l de tampón de carga 10x a cada tubo.
- vii) Se ponen todas las muestras en gel de agarosa al 2% en tampón TAE que contenga bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 μ g/ml.
- viii) Se añade el ADN marcador a una calle de recorrido a cada lado del gel.
- ix) Se ejecuta el gel a un voltaje constante de 150-200 voltios durante unos 30 minutos.
- x) Lectura de los resultados

Se examina el gel con luz UV. En una muestra positiva, se presentará una banda definida que debe co-migrar con el producto de la PCR del control positivo. Se calcula el tamaño de los productos de la PCR en las muestras problema y en el control positivo respecto a los marcadores estándar. El producto de la PCR del control positivo tiene un tamaño de 257 pares de bases. No deben verse bandas en el control negativo.

ix) Opcional

Debe realizarse una prueba confirmativa adicional mediante digestión de los productos amplificados con la endonucleasa de restricción BsmA I. Para esta prueba, se incuba durante 2,5 horas a 55°C un total de 5 µl del producto de ADN amplificado en un volumen final de 20 µl de mezcla de digestión: 2 µl de tampón 10x, 1 µl de BsmA I (5 U/µl) y 12 µl de agua destilada estéril. Luego, se ejecutan las muestras en un gel de agarosa al 3% como se ha descrito anteriormente. El patrón de restricción debe incluir dos fragmentos de 173–177 y 84–80 pares de bases en las muestras positivas.

1.4.5. Procedimiento 2: Protocolo de PCR con TaqMan® (King *et al.*, 2003)

1.4.5.1. Preparación de la muestra

Existen kits comercializados para extracción de ADN destinada a la preparación del molde apropiado para la PCR dependiendo de la muestra que deba analizarse, y pueden ser adecuados para utilizarlos en los Laboratorios de Referencia.

A continuación se describe el procedimiento basado en el *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN) (protocolo de centrifugación). Este kit se puede utilizar con sangre de cerdos sospechosos de estar afectados por la peste porcina. La sangre de los cerdos infectados debe tomarse en EDTA. En estos casos, la detección del VPPA se puede realizar en paralelo con la del virus de la PPC (véase el capítulo 2.8.3 para métodos de detección molecular del VPPC).

- i) Se pipetea 560 µl del tampón AVL suministrado en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml.
- ii) Se añaden 140 µl de muestra problema o control y se mezcla en un vórtex durante 15 segundos. Con las muestras problema se deben procesar en paralelo otras muestras control negativo a la PPA, que consisten en homogenados de bazo, médula ósea (PBM) y células mononucleares de sangre periférica (PBL) de cerdos no infectados. También pueden prepararse controles negativos adicionales de extracción para cada muestra problema y un control negativo no infectado desarrollando en paralelo extracciones con agua libre de nucleasa (todos los controles deben analizarse después por PCR junto con las muestras problema).
- iii) Se incuban por lo menos 10 minutos a temperatura ambiente.
- iv) Se centrifuga el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml brevemente para quitar gotas del interior de la tapa.
- v) Se añaden 560 µl de etanol a la muestra, se someten a un vórtex durante aproximadamente 15 segundos y se centrifugan brevemente para quitar gotas del interior de la tapa.
- vi) Se añaden 630 µl de la solución del paso (v) a una columna de centrifugación QIAamp (en un tubo de recogida de 2 ml) sin mojar el borde. Se cierra la tapa y se centrifuga durante 1 minuto a 6.000 *g*. Se coloca la columna de centrifugación en un tubo de recogida limpio de 2 ml y se desecha el tubo que contiene el filtrado.
- vii) Se abre cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp y se repite el paso (vi).
- viii) Se abre cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp y se añaden 500 µl de tampón AW1. Se cierra la tapa y se centrifuga 1 minuto a 6.000 *g*. Se coloca la columna de centrifugación en un tubo de recogida limpio de 2 ml y se desecha el tubo que contiene el filtrado.
- ix) Se abre cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp y se añaden 500 µl de tampón AW2. Se cierra la tapa y se centrifuga 3 minutos a 20.000 *g*.
- x) Se coloca la columna de centrifugación QIAamp en un tubo nuevo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se desecha el tubo e recogida con el filtrado. Se abre cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp y se añaden 60 µl de tampón AVE. Se cierra la tapa y se incuba 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifuga 1 minuto a 6.000 *g*.
- xi) Se desecha la columna de centrifugación QIAamp. Se guarda a –20°C el ADN extraído (60 µl) hasta que se requiera para el proceso de amplificación por PCR.

1.4.5.2. Soluciones reserva

- i) Agua estéril libre de nucleasa u otra agua estéril apropiada y mezcla base de reacción TaqMan® para PCR (2x).
- ii) Cebadores a una concentración de 50 pmoles/ μ l: Secuencia del Cebador 1, 5'-CTGCT-CATGG-TATCA-ATCTT-ATCGA-3' (cadena positiva); Secuencia del Cebador 2, 5'-GATAC-CACAA-GATC(AG)-GCCGT-3' (cadena negativa).
- iii) Sonda TaqMan® a una concentración de 5 pmoles/ μ l: (5'-[6-carboxi-fluoresceína (FAM)]-CCACG-GGAGG-AATAC-CAACC-CAGTG-3'-[6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA)]).

1.4.5.3. Amplificación por la PCR mediante la prueba TaqMan® (Fernández-Pinero *et al.*, 2010)

- i) Se prepara para cada muestra la mezcla de reacción de PCR que se describe abajo, en un tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 ml. Se prepara la mezcla de reacción de una sola vez, teniendo en cuenta el número de muestras a analizar y contando una muestra adicional.

Agua estéril o libre de nucleasa (7,5 μ l); mezcla base de reacción TaqMan® para PCR 2x (12,5 μ l); cebador 1, 50 pmoles (1,0 μ l); cebador 2, 50 pmoles (1,0 μ l); sonda TaqMan®, 5 pmoles (1 μ l).

- ii) Se añaden 22 μ l de mezcla de reacción de PCR a un pocillo de una placa de reacción óptica MicroAmp® por cada muestra a analizar.
- iii) Se añaden 3 μ l de la muestra del molde extraído o de un control de extracción en blanco, y se cubre bien con una tapa.
- iv) Se centrifuga la placa durante 1 minuto en una centrífuga adecuada para mezclar el contenido de cada pocillo.
- v) Se coloca la placa en un sistema de detección de secuencias TaqMan® para amplificación por PCR y se desarrolla el siguiente programa:

Un ciclo a 50°C durante 2 minutos.

Un ciclo a 95°C durante 10 minutos.

Cuarenta ciclos a 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 1 minuto.

Nota: Si no se dispone de termociclador TaqMan®, se puede utilizar un termociclador ordinario y analizar los productos de PCR por lectores de fluorescencia a punto final o, alternativamente, por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. Se espera un producto de 250 pb.

- vi) Lectura de los resultados

Se asigna un valor de ciclo umbral (C_T) a cada reacción de PCR a partir de un análisis de todas las representaciones gráficas de amplificación (una gráfica de la señal de fluorescencia frente al número de ciclos). Las muestras problema negativas, los controles negativos no infectados o los controles de extracción en blanco deben tener un valor $C_T > 40,0$. Las muestras problema positivas y los controles positivos deben tener un valor $C_T < 40,0$ (las muestras fuertemente positivas tienen un valor $C_T < 30,0$).

Las modificaciones de este protocolo empleando distintos kits comerciales de amplificación pueden aportar rendimientos de la PCR incluso mayores, pero estos kits de amplificación deben estar totalmente validados antes de ser utilizados.

2. Pruebas serológicas

En cerdos recuperados, los anticuerpos persisten durante largos períodos después de la infección, a veces durante toda la vida, y existen varias pruebas para detectar estos anticuerpos, aunque solo unas cuantas se han desarrollado para uso rutinario en los laboratorios de diagnóstico (Escribano *et al.*, 1990; Pastor *et al.*, 1990; Sánchez-Vizcaíno, 1987). La más utilizada es el ELISA (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 1983; Wardley *et al.*, 1979), que es adecuado para examinar sangre o líquidos tisulares. En casos críticos, las muestras que den positivo en el ELISA deben confirmarse mediante otras pruebas, como la IFAT, la tinción con la inmunoperoxidasa o la inmunotransferencia (Escribano *et al.*, 1990; Pastor *et al.*, 1989). Normalmente no se detectan anticuerpos en cerdos infectados con VPPA virulentos, ya que mueren antes de que eso se produzca. En cerdos infectados con virus de la PPA de baja o moderada virulencia se producen anticuerpos, pero no son totalmente neutralizantes.

Recientemente, un amplio estudio llevado a cabo para evaluar la especificidad y la sensibilidad de las pruebas serológicas de detección de la PPA en distintos escenarios epidemiológicos de África y de Europa, con las cepas del VPPA actualmente circulantes (incluido el genotipo II caucásico y las cepas de África oriental que presentan más variabilidad), ha mostrado que las pruebas prescritas por la OIE permiten detectar con exactitud y mucha sensibilidad la presencia de anticuerpos contra la PPA en todas las situaciones epidemiológicas evaluadas (Gallardo *et al.*, 2010).

Cuando la PPA es endémica, la confirmación de casos sospechosos de enfermedad es mejor realizarla mediante una prueba serológica estándar (ELISA), combinada con una prueba serológica alternativa (IFA) o una prueba de detección del antígeno. En algunos países, más del 95% de los casos positivos se han identificado mediante una combinación de pruebas IFA y FAT (Sánchez-Vizcaíno, 2006).

Debe destacarse que cuando los cerdos se infectan por cepas avirulentas o de baja virulencia, las pruebas serológicas pueden ser el único modo de detectar a los animales infectados.

2.1. Enzoinmunoanálisis (prueba prescrita para el comercio internacional)

El ELISA (Pastor *et al.*, 1990) es una prueba directa que permite detectar anticuerpos contra el VPPA en cerdos que han sido infectados por virus con una virulencia baja o moderada. Se dispone de un ELISA comercial muy sensible y específico que se basa en un formato de competición que se ha validado para su uso en distintas situaciones epidemiológicas. Una alternativa más barata consiste en preparar un antígeno soluble para utilizarlo en un ELISA indirecto, y más adelante se describe el procedimiento para usar este antígeno soluble.

El ELISA muestra una baja sensibilidad cuando se conservan de forma deficiente las muestras de suero que van a ser analizadas. Para solucionar este problema, actualmente se están validando varias pruebas ELISA nuevas, basadas en el uso de nuevas proteínas recombinantes del VPPA (Gallardo *et al.*, 2006).

Se recomienda llevar a cabo una segunda prueba confirmativa, como la prueba de la inmunotransferencia, la IFA o la prueba de la inmunoperoxidasa descrita más adelante, en casos de resultado dudoso o de un resultado positivo cuando se sospecha que los sueros se han conservado de forma deficiente.

2.1.1. Preparación del antígeno para el ELISA

El antígeno para ELISA se prepara a partir de células infectadas cultivadas en presencia de suero porcino (Escribano *et al.*, 1989).

- i) Se infectan células MS (células estables de mono) a una multiplicidad de infección de 10 con virus adaptado, y se incuban en un medio que contenga un 2% de suero porcino.
- ii) Se recogen las células a las 36–48 horas de la infección, cuando el ECP es extenso. Se lavan con PBS, se precipitan a 650 **g** durante 5 minutos, se lava el sedimento celular con sacarosa 0,34 M en Tris/HCl 5 mM, pH 8,0, y se centrifuga para sedimentar las células.
Se realizan los pasos (iii) a (v) en hielo:
- iii) Se resuspende el sedimento celular con sacarosa 67 mM en Tris/HCl 5 mM, pH 8,0 (1,8 ml por recipiente de 175 cm²) y después de 5 minutos se deja con agitación durante 10 minutos.
- iv) Se añade el detergente no iónico Nonidet-P40 a una concentración final de 1% (p/v) y se deja 10 minutos (con agitación cuando hayan pasado 5 minutos) para lisar las células.
- v) Se añade sacarosa a una concentración final del 64% (p/p) en Tris/HCl 0,4 M, pH 8,0, y se centrifuga a 1.000 **g** durante 10 minutos para sedimentar los núcleos.
- vi) Se recoge el sobrenadante y se añade EDTA (concentración final 2 mM), beta-mercaptoetanol (concentración final 50 mM) y NaCl (concentración final 0,5 M) en Tris/HCl 0,25 mM, pH 8,0, y se incuban durante 15 minutos a 25°C.
- viii) Se centrifuga a 100.000 **g** durante 1 hora a 4°C sobre una capa de sacarosa al 20% (p/p) en Tris/HCl 50 mM, pH 8,0.

Se extrae la banda situada inmediatamente por encima de la capa de sacarosa y se utiliza como antígeno en el ELISA. Se guarda a –20°C.

2.1.2. Procedimiento del ELISA indirecto (Pastor et al., 1990)

- i) Se antigenan la(s) placa(s) de microtitulación Polysorb para ELISA añadiendo a cada pocillo 100 µl de la dilución recomendada o pre-titulada del antígeno en tampón carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6.
- ii) Se incuban a 4°C durante 16 horas (toda la noche) y a continuación se lavan cinco veces con Tween 20 al 0,05% en PBS, pH 7,2.
- iii) Se diluye el suero problema y los sueros control positivo y negativo a 1/30 con Tween 20 al 0,05% en PBS, pH 7,2, y se añaden 100 µl de cada dilución de suero por duplicado a pocillos de la(s) placa(s) antigenizada(s).

Si se añaden cuatro pares de cada suero control positivo y negativo a pocillos en diferentes partes de la placa, se pueden analizar 40 sueros por duplicado en una placa, como indica en la placa que se muestra abajo.

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

- iv) Se incuban las placas a 37°C durante 1 hora (de modo opcional, en un agitador de placas) y se lavan después cinco veces con Tween 20 al 0,05% en PBS.
- v) Se añaden a cada pocillo 100 µl del conjugado proteína-A/peroxidasa de rábano (Pierce) a la dilución recomendada o pre-titulada en Tween 20 al 0,05% en PBS.
- vi) Se incuban las placas a 37°C durante 1 hora y se lavan después cinco veces con Tween 20 al 0,05% en PBS.
- vii) *Sustrato*: Se añade peróxido de hidrógeno a la solución de sustrato (ortofenilendiamina (OPD) al 0,04% en tampón fosfato/citrato, pH 5,0) a razón de 10µl /25 ml, y se añaden 100 µl de sustrato a cada pocillo. Como alternativa, se puede utilizar solución de sustrato DMAB/MBTH en vez de OPD: Se añaden 200 µl de sustrato a cada pocillo (10 ml de solución DMAB 80,6 mM + 10 ml de solución MBTH 1, 56 mM + 5 µl de H₂O₂).

a) Preparación del sustrato DMAB/MBTH

DMAB – Ácido 3-Dimetilaminobenzoico (SIGMAD-0787); MBTH – 3-Metil-2-benzotiazolinona hidrazona hidrocloreuro monohidrato (IGMA M-8006).

b) Solución DAMB 80,6 mM

Se disuelven 13,315 g de ácido DAMB en 1.000 ml tampón fosfato 0,1 M, pH 7 (5,3 g de KH₂PO₄, 8,65 g de Na₂HPO₄ hasta completar 1000 ml en agua destilada) mediante agitación continua durante 1 hora a temperatura ambiente, ajustando el pH a 7 con NaOH (5 M). Se filtra a través de un embudo.

c) Solución MBTH 1,56 mM

Se disuelve 0,3646 g de MBTH en 1.000 ml tampón fosfato 0,1 M, pH 7 (5,3 g de KH₂PO₄, 8,65 g de Na₂HPO₄ hasta completar 1000 ml en agua destilada) mediante agitación constante durante 1 hora, ajustando el pH a 6,25 con ácido clorhídrico concentrado. Se filtra a través de un embudo.

El volumen necesario por cada placa es: 10 ml de DMAB + 10 ml de MBTH + 5 µl de H₂O₂ al 30%

El sustrato se puede preparar en forma de soluciones reserva, distribuidas en alícuotas y mantenidas a -20°C . Se mezclan las soluciones DMAB y MBTH (1:1) inmediatamente antes de usar y se añade la cantidad requerida de H_2O_2 al 30%.

- viii) Se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 6-10 minutos (antes de que el control negativo empiece a presentar color). El tiempo necesario para la aparición del color dependerá de la temperatura del sustrato en el momento de añadirlo a los pocillos y de la temperatura ambiente.
- ix) Se detiene la reacción añadiendo a cada pocillo 100 μl de ácido sulfúrico 3 N.
- x) Lectura de los resultados: Los sueros positivos tienen color pálido, (amarillo en el caso del sustrato OPD, azul en el caso del sustrato DMAB/MBTH), visible a simple vista, pero para asegurarse de identificar todos los sueros positivos, es necesario leer por espectrofotometría la absorbancia de cada pocillo a 492 nm (en el caso del sustrato OPD) o a 600-620 nm (en el caso del sustrato DMAB/MBTH) en un lector de ELISA. Utilizando el sustrato OPD se considera que un suero es positivo si tiene un valor de absorbancia superior a dos veces el valor medio de la absorbancia de los sueros control negativos de la misma placa. Utilizando el sustrato DMAB/MBTH, la prueba se valida cuando el valor medio de absorbancia del control positivo es más de cuatro veces el valor medio de absorbancia del control negativo.

Para interpretar correctamente los resultados, es necesario calcular el PUNTO DE CORTE que permite diferenciar entre resultados negativos, dudosos y positivos. El punto de corte se establece mediante la siguiente ecuación:

$\text{PUNTO DE CORTE} = \text{suero negativo de Densidad Óptica} \times 1 + \text{suero positivo de Densidad Óptica} \times 0,2.$

- a) Los sueros con una densidad óptica inferior al PUNTO DE CORTE $- 0.1$ pueden considerarse negativos.
- b) Los sueros con una densidad óptica superior al PUNTO DE CORTE $+ 0,1$ pueden considerarse positivos.
- c) Los sueros con una densidad óptica entre el PUNTO DE CORTE $\pm 0,1$ pueden considerarse dudosos y el resultado tendrá que confirmarse mediante la técnica de la inmunotransferencia.

2.2. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

Esta prueba (Pan *et al.*, 1974) debe utilizarse como una prueba confirmativa para sueros procedentes de zonas libres de PPA que son positivos en el ELISA, y para sueros de zonas endémicas que dan resultados dudosos en el ELISA.

2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Se prepara una suspensión de células de riñón porcino o de mono infectadas por el VPPA a una concentración de 5×10^5 células /ml, se esparcen gotas pequeñas en portas, se secan al aire y se fijan con acetona a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los portas se pueden guardar hasta su uso a -20°C .
- ii) Se inactivan los sueros problema por calor a 56°C durante 30 minutos.
- iii) Se añaden a los portas de células infectadas, y a los de células control no infectadas, diluciones apropiadas de los sueros problema y de los sueros control positivo y negativo en solución salina tamponada. Se incuban durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda.
- iv) Se lavan los portas por inmersión cuatro veces en PBS limpio y fresco y después con agua destilada.
- v) Se añaden a todos los portas diluciones recomendadas o predeterminadas de anticuerpos anti Ig de cerdo conjugados con ITCF o de proteína-A conjugada a ITCF. Se incuban durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda.
- vi) Se lavan los portas por inmersión cuatro veces en PBS limpio y fresco y después con agua destilada, se montan con PBS/glicerol, y se examinan en un microscopio de luz ultravioleta con filtros adecuados de barrera y de excitación.
- vii) *Lectura de los resultados:* El suero control positivo debe ser positivo sobre células infectadas y todos los otros controles deben ser negativos antes de la lectura de la

prueba. Los sueros son positivos si los cultivos infectados muestran fluorescencia específica.

2.3. Prueba de la inmunotransferencia (Escribano *et al.*, 1990; Pastor *et al.*, 1989)

Esta prueba debe utilizarse como alternativa a la IFA para confirmar resultados dudosos con sueros determinados. La prueba de inmunotransferencia es muy específica y permite una interpretación más fácil y más objetiva de los resultados y un mejor reconocimiento de las muestras débilmente positivas.

Se han determinado las proteínas víricas que inducen anticuerpos específicos en los cerdos. Estos polipéptidos se han colocado en tiras de antígeno y se ha demostrado que, en la prueba de inmunotransferencia, reaccionan con anticuerpos específicos a partir de los 9 días tras la infección.

2.3.1. Preparación de tiras de antígeno

- i) Se preparan proteínas víricas citoplásmicas solubles como se describe para la preparación de antígeno para ELISA en el apartado B.2.1.
- ii) Se realiza una electroforesis en geles de acrilamida/N,N'-dialiltartardiamida (DATD) al 17% con estándares e peso molecular adecuado.
- iii) Se transfieren las proteínas a membranas de nitrocelulosa de 14 x 14 cm² mediante electroforesis a una corriente constante de 5 mA/cm en tampón de transferencia (metanol al 20% en glicina 196 mM, Tris/HCl 25 mM, pH 8,3).
- iv) Se secan las membranas y se marca el lado en el que se pasaron las proteínas por electroforesis.
- v) Se corta una tira desde el borde del filtro y se realiza inmunotransferencia por el procedimiento que se describe más adelante. Se identifica la región que contenga proteínas de 23–35 kDa comparando con los estándares de peso molecular sometidos paralelamente a la prueba, y se corta esta región en tiras de 0,5 cm de ancho. Se marca cada tira por el lado por el que se pasaron las proteínas por electroforesis.

Estas tiras, de aproximadamente 4 cm. de longitud, constituyen las tiras de antígeno utilizadas en inmunotransferencia y contienen proteínas con las que reaccionarán los anticuerpos de los sueros de cerdos enfermos y convalecientes. En algunos cerdos estos anticuerpos persisten durante toda la vida.

2.3.2. Preparación de la solución del sustrato cloranaftol

Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de ser utilizada.

- i) Se disuelven 6 mg de 4-cloro-1-naftol en 2 ml de metanol y se añade lentamente esta solución a 10 ml de PBS mientras se agita.
- ii) Se elimina por filtración en papel de filtro Whatman No. 1 el precipitado blanco que se forma (opcional).
- iii) Se añaden 4 µl de peróxido de hidrógeno al 30%.

2.3.3. Procedimiento analítico

Las tiras de antígeno deben mantenerse con la cara marcada hacia arriba durante el proceso de la inmunoreacción.

- i) Se incuban las tiras con antígeno en tampón de bloqueo (leche en polvo desnatada al 2% en PBS) a 37°C durante 30 minutos con agitación continua.
- ii) Se preparan diluciones a 1/40 de los sueros problema y de los sueros control positivos y negativos en tampón de bloqueo.
- iii) Se incuban las tiras con antígeno en el suero apropiado a 37°C durante 45 minutos con agitación continua. Se incuba una tira de antígeno con el suero control positivo y otra con el suero control negativo. Estas dos tiras son los controles. Se lavan cuatro veces con tampón de bloqueo; el lavado final debe durar 5 minutos con agitación continua.
- iv) Se añade a todas las tiras con antígeno el conjugado de proteína-A/peroxidasa de rábano a la dilución recomendada o pre-titulada (generalmente a una dilución de 1/1000) en tampón de bloqueo. Se incuba a 37°C durante 45 minutos con agitación continua. Se

lavan cuatro veces con tampón de bloqueo; el lavado final debe durar 5 minutos con agitación continua.

- v) Se prepara la solución de sustrato, se añade a las tiras con antígeno y se incuba a temperatura ambiente durante 5–15 minutos con agitación continua.
- vi) Se detiene la reacción con agua destilada cuando las bandas de proteína sean lo bastante oscuras.
- vii) *Lectura de los resultados:* Los sueros positivos reaccionan con más de una proteína vírica en la tira con antígeno; deben tener un modelo proteico similar y con la misma intensidad que las tiras de antígeno teñidas con el suero control positivo.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Actualmente no hay ninguna vacuna para la PPA.

BIBLIOGRAFÍA

AGÜERO M., FERNÁNDEZ J., ROMERO L., SANCHEZ C., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2003). Highly sensitive PCR assay for the routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4431–4434.

AGÜERO M., FERNÁNDEZ J., ROMERO L., ZAMORA M.J., SANCHEZ C., BELÁK S., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2004). A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever. *Vet. Res.*, **35**, 1–13.

ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2002a). African swine fever. *In: Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, Iowa State University press, pp 119–124. ISBN 0813803837.

ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2002b). African swine fever eradication: the Spanish model. *In: Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, Iowa State University Press, pp 133–139. ISBN 0813803837.

BASTO A.P., PORTUGAL R.S., NIX R.J., CARTAXEIRO C., BOINAS F., DIXON L.K., LEITAO A. & MARTINS C. (2006). Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. *Arch. Virol.*, **151**, 819–826.

BLASCO R., AGÜERO M., ALMENDRAL J.M. & VIÑUELA E. (1989). Variable and constant region in African swine fever virus DNA. *Virology*, **168**, 330–338.

BOOL P.H., ORDAS A. & SANCHEZ BOTIJA C. (1969). El diagnóstico de la peste porcina africana por inmunofluorescencia. (The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence). *Bull. OIE*, **72**, 819–839.

BOSHOF C.I., BASTOS A.D., GERBER L.J. & VOSLOO W. (2007). Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973–1999). *Vet. Microbiol.*, **121** (1–2), 45–55.

CARRILLO C., BORCA M.V., AFONSO C.L., ONISK D.V. & ROCK D.L. (1994). Long-term persistent infection of swine monocytes/macrophages with African swine fever virus. *J. Virol.*, **68**, 580–583.

CHAPMAN D.A., TCHEREPANOV V., UPTON C. & DIXON L.K. (2008). Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J. Gen. Virol.*, **89**, 397–408.

DEVILLIER E.P., GALLARDO C., ARIAS M., DA SILVA M., UPTON C., MARTIN R. & BISHOP R.P. (2010). Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*, **400**, 128–136.

DIXON L.K., ESCRIBANO J.M., MARTINS C., ROCK D.L., SALAS M.L. & WILKINSON P.J. (2005). *In: Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Elsevier/Academic Press, London, UK. 135–143.

ESCRIBANO J.M., PASTOR M.J., ARIAS M. & SANCHEZ VIZCAINO J.M. (1990). Confirmación de sueros positivos a ELISA-peste porcina africana, mediante la técnica de 'immunoblotting'. Utilización de las proteínas inducidas por el virus con pesos moleculares comprendidos entre 23 y 35 kilodaltons, en el desarrollo de un 'kit' de diagnóstico. (Confirmation of sera positive by ASF ELISA with the immunoblotting technique. Use of virus-induced proteins of 23–25 kDa in the development of a diagnostic kit.) *Med. Vet.*, **7**, 135–141.

ESCRIBANO J.M., PASTOR M.J. & SANCHEZ VIZCAINO J.M. (1989). Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false positive reactions in the sero diagnosis of African swine fever. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 1118–1122.

FERNÁNDEZ-PINERO J., GALLARDO C., ELIZALDE M., RASMUSSEN T.B., STAHL K., LOEFFEN W., BLOME S., BATTEN C., CROOKE H., LE POTIER M.F., UTTENTHAL Á., LEBLANC N., ALBINA E., KOWALCZYK A., MARKOWSKA-DANIEL I., TIGNON M., DE MIA G.M., GIAMMARIOLI M., ARIAS M. & HOFFMANN B. (2010). EPIZONE ring trial on ASFV real-time PCR. Annual Meeting of National African Swine Fever Laboratories, 18 May 2010, Pulawy, Poland.

GALLARDO C., BLANCO E., RODRÍGUEZ M.J., CARRASCOSA A. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (2006). Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (3), 1489–1495.

GALLARDO C., MWAENGO D.M., MACHARIA J.M., ARIAS M., TARACHA E.A., SOLER A., OKOTH E., MARTÍN E., KASITI J. & BISHOP R.P. (2009). Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes*, **38** (1), 85–95.

GALLARDO C., SOLER A., SIMÓN A., MARTÍN E., MARTÍN R., PELAYO V., OKOTH E., BISHOP R., SÁNCHEZ M.A., DE MIA G., FASINA F.O., SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. & ARIAS M. (2010). African Swine Fever Threat: Evaluating diagnostic tools with ASFV circulating strains. Annual Meeting of National African Swine Fever Laboratories, 18 May 2010, Pulawy, Poland.

KING D.P., REID S.M., HUTCHINGS G.H., GRIERSON S.S., WILKINSON P.J., DIXON L.K., BASTOS A.D.S. & DREW T.W. (2003). Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods*, **107**, 53–61.

LUBISI B.A., BASTOS A.D., DWARKA R.M. & VOSLOO W. (2005). Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Arch Virol.*, **150** (12), 2439–2452.

MALMQUIST W.A. & HAY D. (1960). Haemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am. J. Vet. Res.*, **21**, 104–108.

PAN I.C., TRAUTMAN R., HESS W.R., DE BOER C.J., TESSLER J., ORDAS A., SANCHEZ BOTIJA C., OVEJERO J. & SANCHEZ M.C. (1974). African swine fever: comparison of four sero tests on porcine serums in Spain. *Am. J. Vet. Res.*, **35**, 787–790.

PASTOR M.J., ARIAS M. & ESCRIBANO J.M. (1990). Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1540–1543.

PASTOR M.J., LAVIADA M.D., SANCHEZ VIZCAINO J.M. & ESCRIBANO J.M. (1989). Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. *Can. J. Vet. Res.*, **53**, 105–107.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (1987). African swine fever diagnosis. In: African Swine Fever, Becker Y., ed. Martinus Nijhoff, Boston, USA, 63–71.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2006). African swine fever. In: Diseases of Swine, Ninth Edition, Straw B., D'Allaire S., Mengeling W., Taylor D., eds. Iowa State University, USA, 291–298 pp.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M., CROWTHER J.R. & WARDLEY R.C. (1983). A collaborative study on the use of the ELISA in the diagnosis of African swine fever. In: African Swine Fever. (CEC/FAO Research Seminar, Sardinia, Sept. 1981). Wilkinson P.J., ed. Commission of the European Communities Publication EUR 8466 EN, 297–325.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M., MARTINEZ-LÓPEZ B., MARTINEZ-AVILÉS M., MARTINS C., BOINAS B., VIAL L., MICHAUD V., JORI F., ETTER E., ALBINA E. & ROGER F. (2009). Scientific Review on African Swine Fever. CFP/EFSA/AHAW/2007/02, pp: 1–141.

VINUELA E. (1985). African swine fever. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **116**, 151–170.

WARDLEY R.C., ABU ELZEIN E.M.E., CROWTHER J.R. & WILKINSON P.J. (1979). A solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of African swine fever antigen and antibody. *J. Hyg.*, **83**, 363–369.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Peste porcina africana (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE, <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>) Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la Peste porcina africana.