CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)

PNT/CISA/PPA/AISLAMIENTO/2/2008

(PROCEDIMIENTO AISLAMIENTO VIRAL EN MAP PARA EL DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO DE LA PESTE PORCINA AFRICANA)

Rev. 1

Fecha de entrada en vigor: Diciembre 2008

REV.	FECHA	EPÍGRAFE/S	CAUSA DEL CAMBIO

Realizado	Revisado	Aprobado
Fdo.: Carmina Gallardo Frontaura Responsable técnico del Laboratorio Nacional y Comunitario de PPA **Fecha**:	**Fdo.**: Miguel Ángel Jiménez Clavero Jefe de Servicio de Coordinación P3 **Fecha**:	**Fdo.**: Marisa Arias Neira Directora Técnica del CISA **Fecha**:

ÍNDICE

1.	**OBJETO**	
2.	**ALCANCE**	
3.	**REFERENCIAS**	
	3.1.	**DOCUMENTOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN**
	3.2.	**DOCUMENTOS A UTILIZAR CONJUNTAMENTE**
4.	**GENERAL**	
5.	**DESCRIPCIÓN**	
	5.1.	**EQUIPOS Y MATERIALES**
	5.2.	**PREPARACIÓN**
	5.3.	**REALIZACIÓN**
	5.4.	**TRATAMIENTO DE RESULTADOS**
	5.5.	**PUNTOS CRÍTICOS**
	5.6.	**MEDIDAS DE SEGURIDAD**
	5.7.	**CONTROL DE CALIDAD**
6.	**ANEXOS**	

1. OBJETO

El presente procedimiento tiene por objeto describir el método para la detección de virus de la peste porcina africana (VPPA) mediante la técnica de aislamiento viral en macrófagos alveolares porcinos.

2. ALCANCE

Este procedimiento es de aplicación a muestras de suero, sangre con anticoagulante (EDTA) y tejidos porcinos. Los tejidos diana para el diagnóstico de la PPA son bazo, hígado, riñón, pulmón, tonsila, corazón, ganglio retro-faríngeo, ganglio gastro-hepático, ganglio mesentérico y ganglio mediastínico.

3. REFERENCIAS

3.1. DOCUMENTOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN

Como referencia básica para la elaboración de este procedimiento se han tomado los criterios establecidos en los siguientes documentos:

1. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Capítulo 2.8.1. OIE, sexta edición, 2008. [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00035.htm]
2. Ensayos de comparación interlaboratorial organizados por el Laboratorio Comunitario de Referencia.
3. PG/LCV/001 Procedimiento para la elaboración de documentos, Edición 01.
4. Borca M., Carrillo C, Zsak L, Laegreid WW, Kutish GF, Neilan JG, Burrage TG, Rock DL. (1998). “Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine”. J Virol Apr;72(4):2881-9.
5. Carnero R., Larenaudie, B., Ruiz-Gonzalvo, F. y Haag, J. (1967). Peste porcine africaine. Etudes sur la reaction d'hemadsorption et son inhibition par des anticorps specifiques. Rec. Vet. Med. 143, 49-59.
6. Carrasco L., de Lara FC, Martin de las Mulas J, Gomez-Villamandos JC, Hervas J, Wilkinson PJ, Sierra MA . (1996a). “Virus association with lymphocytes in acute African swine fever”.Vet Res;27(3):305-12
7. Galindo I, Almazan F, Bustos MJ, Viñuela E, Carrascosa AL. (2000). “African swine fever virus EP153R open reading frame encodes a glycoprotein involved in the hemadsorption of infected cells”. Virology Jan 20;266(2):340-51.
8. Malmquist, W. y Hay, D. (1960). “Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures”. Am. J. Vet. Res. 21, 104-108.

PPA revisiones:

1. Arias, M.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2002). “African Swine Fever (ASF)”. In Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Iowa State University press, ISBN: 0813803837. Eds. A. Morilla, K-J Yoon, J. Zimmerman. Pp 119-124.
2. Arias, M.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2002). “African Swine Fever Eradication: The Spanish model. In Trends in Emerging Viral Infections of Swine”. Iowa State University press, ISBN: 0813803837. Eds. A. Morilla, K-J Yoon, J. Zimmerman. Pp 133-139.
3. 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”. [www.sanidadanimal.info] on line, July, 2002/.

3.2. DOCUMENTOS A UTILIZAR CONJUNTAMENTE

- Procedimiento para la detección del VPPA mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) (PNT/CISA/PPA/PCR/1/2008)
- Procedimiento para la detección del VPPA mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR) (PNT/CISA/PPA/PCR/2/2008)

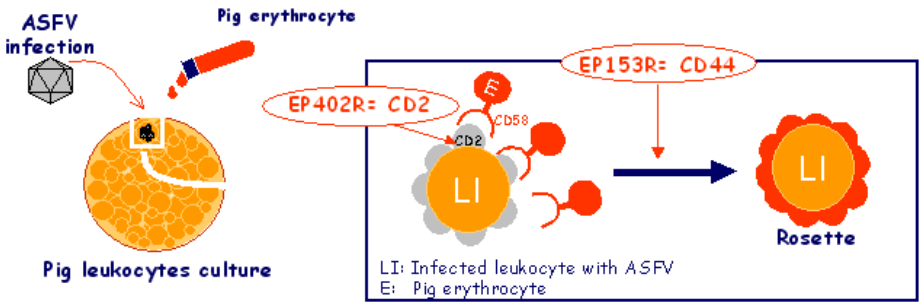
4. GENERAL

4.1 Abreviaturas

PPA: Peste porcina africana
VPPA: Virus de la Peste Porcina Africana.
HAD: hemoadsorción
MAP; macrófagos alveolares porcinos
ECP: efecto citopático
CP: Control positivo de referencia.
CN: Control negativo de células sin inocular.
r.p.m; revoluciones por minuto

4.2 Principio

El aislamiento del VPPA se realiza en cultivos primarios de macrófagos porcinos. El VPPA es capaz de infectar y replicarse de forma natural en cultivos de leucocitos de sangre periférica de cerdo, donde además de producir un efecto citopático (ECP) en los macrófagos infectados, previamente a la lisis celular origina un efecto característico de Hemoadsorción (HAD), que consiste en la adsorción de los hematíes del cerdo alrededor de los leucocitos que han sido infectados por PPA. La imagen al microscopio se presenta en forma de morula o corona (roseta) de eritrocitos alrededor de los leucocitos.
El efecto de la hemoadsorción está unido a la presencia de dos genes en el genoma del VPPA. El ORF EP402R que codifica para una proteína homóloga al marcador de superficie molecular CD2, y el gen EP153R que codifica para una proteína homóloga al marcador de superficie molecular CD44. El primero es el responsable del fenómeno de la hemoadsorción debido a que cuando el virus replica en las células diana, expresa el CD2 cómo marcador de superficie produciéndose la unión entre el CD58 presente en la superficie de los eritrocitos y el CD2 de las células infectadas. Esta unión que origina una estructura en forma de mórula o roseta, se encuentra estabilizada por la acción de la proteína codificada por el gen EP153R.



5. DESCRIPCIÓN

5.1. EQUIPOS Y MATERIALES

MATERIALES NECESARIOS.

- Agitador de placas
- Baño de incubación
- Balanza electrónica
- Bisturís estériles
- Botellas de vidrio estériles de 250ml y 500 ml.
- Cabina de flujo laminar de bioseguridad tipo II
- Congelador de -20
- Congelador -70
- Centrífuga de mesa Megafuge1.0R (rotor Heraeus #7570)
- Centrífuga SORVALL RC6 (rotor SLA 1500)
- Criotubos
- Cubetas desechables
- Contenedor de nitrógeno líquido
- Embudo de vidrio estéril
- Filtros MINISART 0,45 micras.
- Gasas estériles
- Guantes de látex o de nitrilo
- Incubador de CO_2/ 37ºC
- Maceradores de vidrio
- Micropipetas automática monocanal de 1-10µl.
- Micropipetas automática monocanal de 10-100µl.
- Micropipetas automática monocanal de 10-200µl.
- Micropipetas automática monocanal de 200-1000µl.
- Micropipetas automática multicanal de 5-50µl.
- Micropipetas automática multicanal de 50-300µl.
- Microscopio invertido de contraste de fase.
- Nevera de 4ºC
- Papel adsorbente
- Placas de 96 pocillos de fondo plano (NUCLONTM “Surface”, Nunc).
- Cámara de recuento THOMA o NEUBAHUER
- pH-metro
- Pinzas estériles
- Pipeteador automático Pipetboy acu o equivalente
- Pipetas de vidrio o plástico, estéril, para descargar 1-10ml.
- Puntas de pipetas desechables, estéril.
- Tijeras estériles
- Tubos eppendorf (o equivalentes) de 0,5ml; 1,5ml y 2ml.
- Tubos de plástico de fondo cónico estériles de 12 ml
- Tubos FALCON estériles de 50 ml.
- Tubos de centrífuga SORVALL 500 ml
- Vórtex.

REACTIVOS NECESARIOS.

- **Ácido-citrato-dextroxa (ACD);**

  citrato trisódico $2H_2O$ ---------- 11 gr
  Ácido cítrico $1H_2O$ ---------- 4.34 gr
  Glucosa ---------- 13.35 gr
  H_2O destilada ---------- hasta 500 ml

  Esterilizar por filtración y conservar a 4º
- **Aminoácidos no esenciales** [NEAA 100x BioWhittaker]
  Conservación; 4º C
- **Colorante de Turk;** líquido comercial que lleva Ac. Acético y violeta de gentamina.
  Conservación; temperatura ambiente
- **CP:** Control positivo de VPPA de referencia. Se utiliza el aislado español del VPPA hemoadsorbente E70 producido en leucocitos.
  Conservación; -70º C
- **DMEM** [medio Dulbecco's Modified Eagle's con 4.5g/L Glucosa -Bio-Whittaker]
  Conservación; 4º C
- **Glutamina** [4mM GIBCO]
  Alícuotas de 5ml/ Conservación; -20º C
- **Medio de cultivo de MAP;** DMEM [medio Dulbecco's Modified Eagle's con 4.5g/L Glucosa -Bio-Whittaker] suplementado con un 20% de SFB, 1% aminoácidos no esenciales, 1% de glutamina, 1% piruvato sódico, 250µg/ml de nistatina, y como antibiótico gentamicina.
  Conservación; 4ºC
- **Nistatina** [10.000 U/ml, GIBCO]
  Alícuotas de 650µl / Conservación; -20º C
- **Penicilina** [5.000U/ml)]/**Streptomicina** [5.000U/ml] – BioWhittaker
  Alícuotas de 5ml/ Conservación; -20º C
- **Piruvato sódico** [Bio-Whittaker],
  Conservación; 4º C
- **Sulfato de gentamicina** [50mg/ml – BioWhittaker]
  Conservación; 4º C
- **Solución de congelación;** Suero fetal bovino (SFB) + 10% Dimetil sulfóxido (DMSO)
  Se prepara en el momento de uso
- **Solución de lavado pulmonar;** PBS1 x + Sulfato de gentamicina (50 mg/L) + 3% ACD .
  Conservación; 4ºC
- **Suero fetal bovino SFB** [GIBCO]
  Alícuotas de 50ml/ Conservación; -20º C
- **Suspensión de eritrocitos de cerdo diluidos al 1/10 en PBS 1x**
  Conservación; 4º C
- **Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2**

  ClNa ---------- 8,0 g
  ClK ---------- 0,2 g
  $P0_4H_2K$ ---------- 0,2 g
  $P0_4HNa_2$ ---------- 1,15 g
  H_20 destilada ---------- 1000 ml

  Conservación; temperatura ambiente

5.2. PREPARACIÓN

OBTENCIÓN DE MAP

Los MAP se obtienen de pulmones de lechones (2-3 semanas) por perfusión de la cavidad pulmonar mediante lavado bronco-alveolar con una solución de lavado pulmonar (descrita en el apartado 5.1 de equipos y materiales) según el siguiente protocolo;

1. Cerrar la tráquea con un fórceps antes de seccionarla

2. Lavar bien los pulmones con agua destilada separando el corazón.

3. Se envuelven los pulmones en papel adsorbente y se introduce en su interior mediante un embudo estéril 500-600 ml de la solución de lavado

4. Masajear los pulmones durante 1-2 minutos e introducir el lavado alveolar en una botella (este proceso se repite 2-3 veces).

5. Distribuir en tubos de centrífuga de 250 ml

6. Centrifugar en centrífuga SORVALL RC6 (rotor SLA 1500) a 2.500g (4.000 r.p.m) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

7. Resuspender el precipitado en 50 ml de medio de lavado y pasarlo a un tubo FALCON estéril de 50 ml

8. Centrifugar en centrífuga de mesa [Megafuge 1.0R rotor Heraeus #7570mesa] 2.080 g (4.000 r.p.m) durante 2 minutos a temperatura ambiente.

9. Repetir el lavado dos veces

10. Despreciar el sobrenadante y resuspender el precipitado celular en un volumen conocido (p.ej. 5ml) de SFB. Se realiza un recuento de MAP en cámara de recuento THOMA, calculando el volumen total de de solución de congelación (descrita en el apartado 5.1 de equipos y materiales) necesario para tener una concentración final de 5×10^7 células (MAP)/ml.

11. Distribuir las células resuspendidas en la solución de congelación en la concentración de 5×10^7 células (MAP)/ml en criotubos (1ml/criotubo) y congelar en nitrógeno líquido.

CULTIVO DE MAP

1. Descongelación de los MAP a 37º en baño de agua (ampollas de 1 ml).

2. Se pasan a un tubo cónico estéril de 12ml y se centrifugan en centrífuga de mesa [Megafuge 1.0R rotor Heraeus #7570mesa] 1.050g (2.000 r.p.m) durante 10 minutos.

3. Lavar el precipitado celular con 5 ml de PBS 1x estéril centrifugando en centrífuga de mesa [Megafuge 1.0R rotor Heraeus #7570mesa] 1.050g (2.000 r.p.m) durante 10 minutos.

4. Resuspender el precipitado celular en 10 ml de medio de cultivo de macrófagos teniendo una concentración final de $5x10^6$ células/ml que se distribuyen a una placa de 96 pocillos, 100 µl por pocillo (400.000 células viables por pocillo). Las placas se incubaron a 37ºC en incubador de CO_2 entre 1-4 horas antes de su utilización.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

NOTA: Cada muestra debe haber sido previamente ingresada por lo que estará identificada con un número de registro de entrada en el CISA y un número de identificación de la muestra (ID muestra) en caso de que hayan ingresado más de una muestra del mismo remitente.

Muestras de suero (sangre completa sin anticoagulante);

1. Si la muestra viene sin procesar (sangre sin anticoagulante) se incuba primero 1 hora a 37ºC y después toda la noche a 4ºC para permitir la separación del coágulo sanguíneo.
2. Se retira el coágulo y se centrifuga en centrífuga de mesa [Megafuge 1.0R rotor Heraeus #7570] a 780g (1.500 r.p.m) durante 10 minutos.
3. Se recoge el sobrenadante y se filtra en filtros MINISART de 0,45 micras.
4. El sobrenadante filtrado se trata con antibióticos a razón de 4.000 U.I. de penicilina y 3mg de estreptomicina por ml. Se deja 1 hora a 4º para que actúen los antibióticos.
5. La muestra filtrada y tratada con antibióticos se pasa a un tubo cónico de 1,5ml "tipo eppendorf", el cual se rotula con el número de registro de entrada en el CISA y la ID de la muestra correspondiente.

Muestras de sangre completa con anticoagulante (EDTA);

1. Preparar una dilución 1/10 de la sangre en PBS1x estéril pH 7,2.
2. Tratar la muestra diluida con antibióticos a razón de 4.000 U.I. de penicilina y 3mg de estreptomicina por ml. Se deja 1 hora a 4º para que actúen los antibióticos.
3. La muestra tratada con antibióticos se pasa a un tubo cónico de 1,5ml "tipo eppendorf", el cual se rotula con el número de registro de entrada en el CISA y la ID de la muestra correspondiente.

Muestras de tejidos porcinos;

1. Preparar una suspensión 10% de macerado de órgano problema en PBS1x estéril pH 7,2. (1g de órgano en 10 ml de PBS1x estéril).
2. Centrifugar la suspensión en centrífuga de mesa [Megafuge 1.0R rotor Heraeus #7570] a 1.050g (2.000 r.p.m) durante 10 minutos.
3. Se recoge el sobrenadante y se filtra en filtros MINISART de 0,45 micras.
4. El sobrenadante filtrado se trata con antibióticos a razón de 4.000 U.I. de penicilina y 3mg/ml de estreptomicina. Se deja 1 hora a 4º para que actúen los antibióticos.
5. La muestra filtrada y tratada con antibióticos se alícuota en tubos cónicos de 1,5ml "tipo eppendorf", el cual se rotula con el número de registro de entrada en el CISA y la ID de la muestra correspondiente.

5.3. REALIZACIÓN

1. Inocular el cultivo celular de MAP entre 1-4 horas después de su preparación con una dilución 1/10 (10 µl/pocillo) de la muestra problema estéril tratada según se especifica en el apartado anterior. Se inoculan como mínimo cuatro pocillos de la placa por muestra.

2. Dejar otros 4 pocillos sin inocular como controles de la evolución del cultivo (CN) y cuatro pocillos inoculados con CP para comprobar que realmente ha funcionado la técnica y poder comparar las muestras problemas.

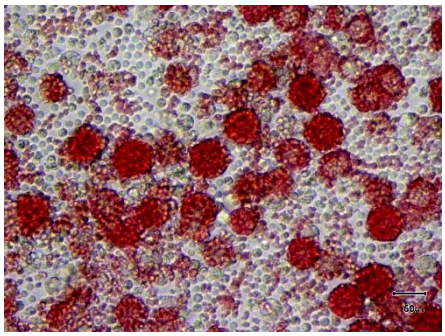
3. Añadir 20 µl/pocillo de una dilución final 1/100 de los eritrocitos en PBS 1x estéril.

4. Las placas se incuban a 37º en atmósfera de CO_2 hasta un máximo de 1 semana leyéndolas diariamente para comprobar la aparición del efecto citopático y/o de la HAD.

5.4. TRATAMIENTO DE RESULTADOS

NOTA: Al momento de la lectura de resultados, cada pocillo es analizado de forma individual comparando los resultados con los controles. Siempre se debe incluir en cada ensayo CN y CP.

Los pocillos inoculados serán observados diariamente para comprobar la **aparición de la HAD o del ECP.** Paralelamente son observados los pocillos controles para comprobar el desarrollo y vitalidad de los cultivos comparativamente con las muestras. La primera lectura se puede realizar a las 14-16 horas post-inoculación. Las siguientes cada 24 horas.
Para la observación al microscopio de la **reacción de HAD** en los pocillos es necesario remover los eritrocitos sedimentados mediante agitación suave de la placa. Con la agitación los eritrocitos no adsorbidos se separan y deslizan sobre los leucocitos y solamente los adsorbidos quedan fijados a los leucocitos infectados, en caso positivo, formando una corona de una o varias capas de hematíes alrededor de la célula.
El periodo de lectura se extenderá hasta la **aparición de la HAD o del efecto ECP sin HAD**. Si no se observan cambios en los cultivos, el período de observación será de 7 días. La **imagen de la HAD** se presenta en forma de una mórula o corona (roseta) de eritrocitos alrededor de los leucocitos infectados.



El **ECP** puede apreciarse a partir de las 12 horas de la infección celular y consiste en un redondeamiento de las células, vacuolización del retículo endoplásmico e incremento de las estructuras lisosomales, produciéndose finalmente la lisis celular Se originan también cambios a nivel del núcleo, incluída la condensación de la cromatina y la aparición de estructuras fibrilares. Se manifiesta por una marcada reducción del número de celulas adheridas a la pared del pocillo en comparación con los pocillos controles no infectados.

Cuando está presente la HAD, el diagnóstico es positivo de PPA. **La observación del ECP sin HAD puede ser debido a un virus de PPA no hemoadsorbente, a otros virus diferentes de PPA o a la toxicidad del inóculo (efecto citotóxico).**

Para saber si el **posible ECP sin HAD** es producido por el VPPA y poder diferenciarlo de los demás se recurre al examen del sedimento celular por la técnica de PCR (PNT/CISA/PCR/1/2008). Cuando el resultado es negativo a partir del líquido sobrenadante de los pocillos inoculados que muestran efecto citopático de los cultivos se **subinoculan nuevos cultivos de leucocitos (2º pase).** El enriquecimiento del

virus permite ver la HAD. Cuando en este segundo pase los cultivos experimentan también efecto citopático sin HAD se repite el tercer pase por leucocitos. Entonces puede aparecer la HAD o continuar el efecto citopático sin HAD en pases sucesivos, en el caso de cepas no hemoadsorbentes.
Para mayor seguridad, en todas las muestras negativas en el primer pase, se realiza de forma sistemática la subinoculación en cultivos de leucocitos, antes de formular el dictamen negativo.

5.5. PUNTOS CRÍTICOS

La técnica del aislamiento viral del VPPA presenta unos resultados de especificidad y sensibilidad totalmente adecuados para el diagnóstico virológico de la PPA. Sin embargo hay que tener en cuenta a la hora de la realización de la técnica una serie de puntos críticos que afectan o pueden afectar al resultado obtenido. Estos puntos críticos son;

1. La **realización de la técnica es muy laboriosa y lenta** y requiere entre 5 y 10 días para dar un diagnóstico de la enfermedad siempre que se observe HAD en un primer pase. En caso contrario el diagnóstico puede tardar en darse entre 15-30 días desde que se reciben las muestras. Por este motivo no se utiliza cómo técnica de elección para un diagnóstico virológico rutinario sino cómo técnica de confirmación de aquellos resultados que han dado positivos mediante la técnica de PCR.
2. La **observación del ECP sin HAD** puede ser debido a **otros virus diferentes de PPA o a la toxicidad del inóculo (efecto citotóxico)**. Esto dificulta el diagnóstico especialmente cuando se trata de cepas no hemoadsorbentes del VPPA y requiere una posterior confirmación mediante la técnica de PCR.
3. Para evitar la **HAD inespecífica**, el medio debe contener **suero o plasma del mismo cerdo del que se obtienen los leucocitos.** Si se prueba un gran volumen de muestras, los sueros homólogos pueden reemplazarse por suero que se haya identificado como capaz de evitar la formación de auto-rosetas inespecíficas en un pre-análisis.
4. Para evitar la **HAD inespecífica**, los **eritrocitos deben proceder del mismo cerdo del que se obtienen los leucocitos.**
5. Estudios previos han demostrado que **muestras en estado de putrefacción** son inadecuadas para aislar el virus. Las muestras deben mantenerse tan frías como sea posible sin congelarlas pero manteniendo la cadena de frío. En países donde es difícil mantener la cadena de frío y se procede al envío de las mismas en solución salina con glicerol se ha detectado una menor probabilidad de aislar el virus. Asimismo, se ha visto que el análisis de muestras liofilizadas influye de forma negativa en el aislamiento viral.
6. La realización de la técnica requiere de un **animalario** para la obtención de sangre periférica de cerdo donante y de **laboratorios equipados para análisis virológicos y cultivos celulares** con unos requisitos mínimos de bioseguridad.

5.6. MEDIDAS DE SEGURIDAD

1. Leer atentamente el protocolo.
2. Resulta esencial realizar los procedimientos de forma que se evite la contaminación de los cultivos celulares.
3. Conservar los reactivos a la temperatura indicada antes de su utilización y en condiciones de esterilidad.
4. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
5. No pipetear los reactivos con la boca.
6. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
7. Incluir sistemáticamente un CP y CN.

6. ANEXOS

Anexo 1. Plantilla CISA/PPA/AISLAMIENTO/2/2008

REGISTRO ENTRADA CISA:
CÉLULAS:
FECHA CULTIVO CELULAR:
FECHA INOCULACIÓN MUESTRAS:
TÉCNICO:

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