



TÉCNICA DE LA HEMOADSORCIÓN (HAD) PARA PPA

• INTRODUCCIÓN

El aislamiento del virus de la PPA 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 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

• MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS.

1.1. Células

- **LEUCOCITOS:** obtenidos a partir de sangre periférica defibrinada de cerdo.
- **MAP:** macrófagos alveolares porcinos obtenidos mediante lavado broncoalveolar de cerdo donante.

1.2. Medios de cultivo

- **SUERO PORCINO;** los leucocitos se cultivaron en suero porcino homólogo (obtenido del mismo cerdo donante).
- **EMEM** (medio mínimo esencial de EAGLE -Bio-Whittaker-); se utilizó para los MAP suplementado con un 20% de SFB (Bio-Whittaker), 1% aminoácidos no esenciales, 1% de glutamina (4mM) (GIBCO) y como antibiótico gentamicina (50mg/ml) de Bio-Whittaker.



1.3. Material de plástico y vidrio para el crecimiento de células

- Placas de 96 pocillos de fondo plano (NUCLON™ “Surface”, Nunc) para realizar los ensayos de hemoadsorción.
- Cámara de recuento THOMA

1.4. Tampones y reactivos

- Solución de lavado pulmonar; EDTA 2 mM en PBS pH 7.4, Penicilina 500 U/ ml, Gentamicina 40 ug/ml y Glucosa 1 mg/ml.
- Sólución de lavado de MAPs; medio RPMI-M \square con SFB 11,5%, Hepes 20 mM pH 7, Penicilina 400 U/ ml, Gentamicina 56 ug/ml, L-Glutamina 2.4 mM y 2-Mercaptoetanol 0,05 mM.
- Sólución de congelación; SFB + DMSO 10%
- Solución de lisis de eritrocitos : Cloruro amónico 0,83% estéril.

NH₄Cl -----8,3 gr.

H₂O ----- hasta 1000 ml.

- PBS1x pH 7.2

ClNa ----- 8,0 gr. (1,4 mM)

ClK----- 0,2 gr. (2,7 mM)

KH₂PO₄----- 0,2 gr. (1.5 mM)

Na₂HPO₄----- 1,15 gr. (8 mM)

H₂O destilada ----- 1000 ml.

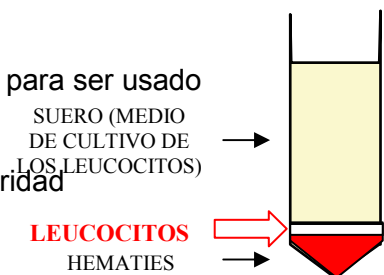
- Colorante de Turk; líquido comercial que lleva ac. Acético y violeta de gentamina.



• METODOLOGÍA

1. Obtención y cultivo de leucocitos

1. La sangre es extraída por punción de la vena cava anterior de cerdos donantes con un peso vivo de 40 a 100 kilos, usando el aparato de transfusión que la conduce directamente a un desfibrinador mecánico, donde es agitada durante 15-30 minutos. La cantidad de sangre que se puede extraer es de 20 ml por kilo de peso vivo.
2. La sangre desfibrinada se transvasa por medio del mismo aparato de transfusión desde el desfibrinador a las botellas de centrífuga de 500 ml.
3. Se centrifuga a 700g durante 30 minutos sin freno.
4. El suero sobrenadante es trasvasado a un matraz de 500ml para ser usado como medio de cultivo de los leucocitos
5. Se extrae la capa de células blancas (**leucocitos**) por capilaridad evitando coger un exceso de hematíes.
6. Recoger aparte un volumen de hematíes, diluidos con PBS 1/10, para la posterior reacción de la hemoadsorción.

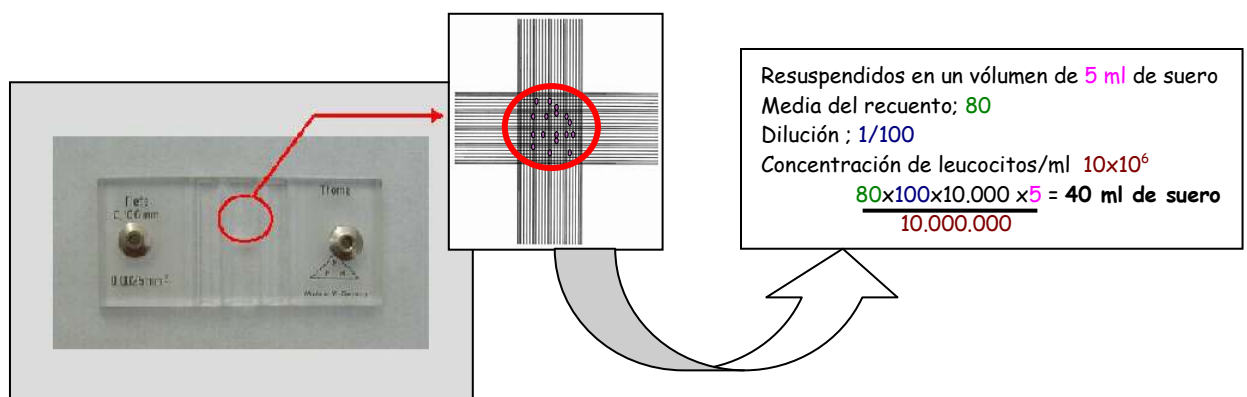


Un factor importante para la especificidad del test es el uso del suero del mismo cerdo del que se han obtenido los leucocitos (suero homólogo), así como los hematíes necesarios para la reacción. Esto evita las reacciones inespecíficas de aglutinación al mezclar leucocitos y suero procedentes de diferentes animales.

7. Una vez obtenidos los leucocitos, se depositan en un tubo de centrifuga y se añade tres veces el volumen de leucocitos recogidos de cloruro amónico 0,83%. Mezclar y dejar 15' en reposo (LISIS DE LOS ERITROCITOS QUE HAYAN QUEDADO).
8. Centrifugar 650g /15'
9. Se retira el sobrenadante y se repiten los pasos 7 y 8.
10. Retirar el sobrenadante y recoger el sedimento celular (leucocitos limpios) en 5-10 ml de suero de cerdo obtenido en el punto 4.
11. Se realiza un recuento de leucocitos, colocando el volumen total a una concentración de $8-10 \times 10^6$ leucocitos por ml. de suero

Ejemplo:

- 5 ul de los leucocitos resuspendidos en 5 ml de suero porcino homólogo + 495 ul del líquido de Turk. (dilución 1/100)
- Vortex
- Cogemos 25-30 ul y lo ponemos en la cámara de recuento THOMA



Cámara Thoma para el conteo del número de células

Características de la cámara de contaje (Cámara Thoma)

- ❑ 400 celdillas pequeñas con $S=0.0025 \text{ mm}^2$ / celdilla
- ❑ Agrupadas en 16 celdas con $S= 0.0625 \text{ mm}^2$ / celda
- ❑ Superficie Total = ST = 1 mm^2
- ❑ Altura con cubre-objetos = 0.1 mm
- ❑ Volumen Total de la cámara VT = 0.1 mm^3

12. Finalmente, se reparte el cultivo obtenido en la placa Microtiter a 200 μl por pocillo (300.000 células/pocillo). Las placas se mantienen en atmósfera de CO_2 y a una temperatura de 37° entre **3-4 días**, para permitir la maduración de los leucocitos.

2. Obtención y cultivo de MAP

• **Obtención**

Los MAP se obtienen por perfusión de la cavidad pulmonar mediante lavado bronco-alveolar con una solución de lavado pulmonar (descrita en el apartado 2.4. de materiales) según el siguiente protocolo;

- ❑ Cerrar la tráquea con un fórceps antes de seccionarla
- ❑ Lavar bien los pulmones con agua del grifo separando el corazón.



- Se envuelven los pulmones en papel secante y se introduce en su interior mediante un embudo estéril 500-600 ml de la solución de lavado
 - Masajear los pulmones durante 1-2 minutos y se vierte el lavado alveolar en una botella (este proceso se repite 2-3 veces)
 - Centrifugar en tubos de centrífuga de 250 ml (rotor GSA) durante 15 min./700g
 - Resuspender el pellet en 30 ml de medio de lavado y pasarlo a un tubo falcon de 50 ml
 - Centrifugar en centrífuga de mesa 2 min./700g (20°C)
 - Repetir el lavado dos veces
 - Resuspender en la solución de congelación (apartado 2.4) a una concentración de 5×10^7 células /ml. Se mantienen en nitrógeno líquido hasta el momento de ser usadas.
- **Cultivo de MAP.**
 - Descongelación de los MAP a 37° en baño de agua (ampollas de 1 ml)
 - Se pasan a un tubo cónico de 10 ml y se centrifugan 10 min./700g en centrífuga de mesa
 - Se lava el pellet con 5 ml de PBS 1x estéril centrifugando 10 min./700g en centrífuga de mesa
 - Se resuspende el pellet en 10 ml de medio **EMEM** (minimal essential medium EAGLE -Bio-Whittaker-) con 20% de SFB a una concentración final de 5×10^6 células/ml y se distribuyen a una placa de 96 pocillos, 100 µl por pocillo (400.000 células viables por pocillo). Las placas se incubaron a 37° **4 horas** antes de su utilización.

3. Inoculación del cultivo de leucocitos y MAP

1. Preparar un macerado de bazo, pulmón, u otro órgano infectado con PPA en PBS1x pH7,2. Poner aproximadamente 1g de órgano por cada 10 ml de PBS.
2. Se centrifuga la suspensión a 600g. durante 20 minutos.
3. Se recoge el sobrenadante y se le añaden antibióticos a razón de 4.000 U.I. de penicilina y 3mg de estreptomycinina por ml. Se deja 1 hora a 4° para que actúen los antibióticos.



Una alternativa es filtrar el macerado por un filtro de 45 micras de diámetro.

4. Inocular los leucocitos (a los 3-4 días) o MAP (a las 4 horas) con 20µl de macerado filtrado o estéril, como mínimo cuatro pocillos de la placa por muestra.
5. Dejar otros 4 pocillos sin inocular como controles de la evolución del cultivo. Poner controles, tanto positivos como negativos para comprobar que realmente ha funcionado la técnica y poder comparar las muestras problemas.
6. Incubar 24 h a 37°C con CO₂.

Hemoadsorción

Las infecciones se dejan 24 horas para la adsorción y replicación del virus. Pasadas 24 horas se añaden 20 µl una dilución 1:100 en PBS 1x de hematíes procedentes del mismo cerdo donante. Las placas se incuban a 37° en atmósfera de CO₂ hasta un máximo de 1 semana.

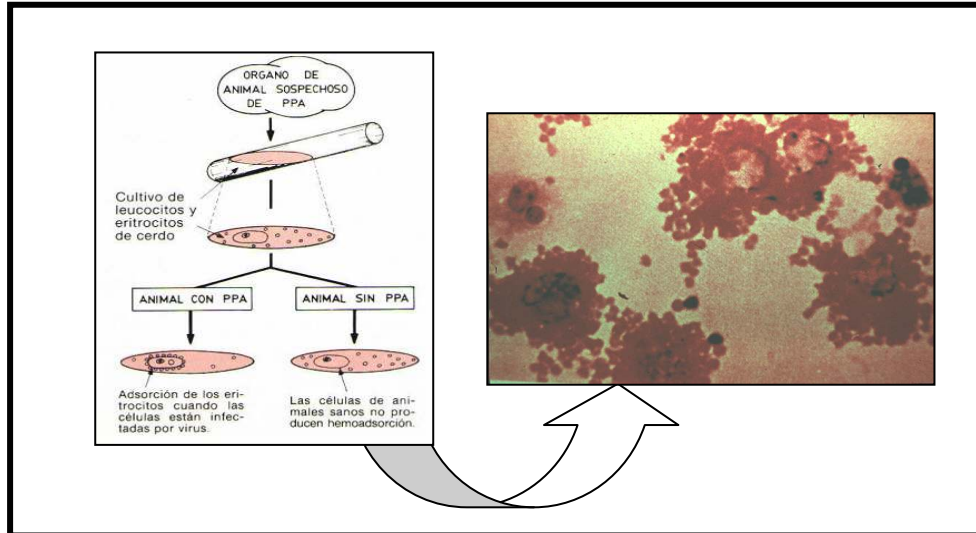
• INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

Los pocillos inoculados serán observados diariamente para comprobar la aparición de la HAD o del efecto citopático. 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 hemoadsorción en los pocillos es necesario remover los eritrocitos sedimentados mediante agitación suave de la placa. Con la agitación los eritrocitos no absorbidos 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 citopático sin HAD. Si no se observan cambios en los cultivos, el período de observación será de 8 días.

La imagen de la HAD se presenta en forma de una mórula o corona (roseta) de eritrocitos alrededor de los leucocitos infectados.



Esquema de la técnica de Hemoadsorción en el diagnóstico de la PPA

El efecto citopático 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, incluida la condensación de la cromatina y la aparición de estructuras fibrilares. Se manifiesta por una marcada reducción del número de células 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 efecto citopático sin HAD puede ser debido a un virus de PPA no hemoadsorbente, a otros virus diferentes de PPA o a la toxicidad del inoculo (efecto citotóxico).

Para saber si el posible efecto citopático sin HAD es producido por el VPPA y poder diferenciarlo de los demás se recurre al examen del sedimento celular por IFD y/o PCR. Cuando el resultado es negativo a estas técnicas se realiza un segundo pase a nuevos cultivos de leucocitos a partir del medio de cultivo de la primera inoculación.

SUBCULTIVOS DE LEUCOCITOS

A partir del líquido sobrenadante de los pocillos inoculados que muestran efecto citopático de los cultivos se subinoculan nuevos cultivo 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 hemoabsorbentes.

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.

REFERENCIAS

- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.:

- Arias, M., Sánchez-Vizcaíno, JM (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.
- Arias, M., Sánchez-Vizcaíno, JM (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.
- Arias, M; Sánchez, C; González, MA; Carrasco, L; y Sánchez-Vizcaíno, JM. (2002). "Peste porcina Africana" In *curso digital de enfermedades infecciosas porcinas*. www.sanidadanimal.info /on line, July, 2002/.



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y
ALIMENTARIA (INIA)

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE
INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN SANIDAD ANIMAL

EU AND OIE REFERENCE LABORATORY FOR AFRICAN SWINE FEVER

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA)

Valdeolmos, 28130, Madrid, SPAIN.

Telf.: +91 6202300; Fax.: + 91 6202216

Contactos.: Dr. Carmina Gallardo gallardo@inia.es
Dr. Marisa Arias arias@inia.es