



DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO PPA: IMMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

• INTRODUCCIÓN

La inmunofluorescencia directa consiste en la detección del virus de la PPA en órganos o vísceras de animales sospechosos de sufrir la enfermedad.

La técnica se fundamenta en la unión del antígeno viral con anticuerpos específicos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Mediante el microscopio de fluorescencia se observan los complejos antígeno-anticuerpo positivos con fluorescencia. Esta técnica se utiliza desde 1968 para la detección del virus de la PPA y es capaz de detectar el antígeno viral en muestras de órganos de animales infectados.

• MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS.

• PBS (pH 7,2)

NaCl (Merck 1.06404)	8.0 g
KH ₂ PO ₄ (Merck 1.04873)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O (Merck 1.06586)	2.9 g
KCl (Merck 1.04936)	0.2 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar el pH antes de utilizarlo. Conservar a + 4°C.

- Impronta de órganos de animales sospechosos de tener la enfermedad y de animales no infectados como control negativo.
- Anticuerpos anti-VPPA marcado con FITC
- PBS a pH 7,2
- Glicerina tamponada
- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7.2
- Portaobjetos

- Microscopio de fluorescencia.

- **METODOLOGÍA**

1. Preparar las improntas de los órganos sospechosos.
2. Fijar las improntas con calor durante 15 minutos usando una lámpara de calor de 60 vatios situada aproximadamente a 20 cm del porta.
3. Añadir el anticuerpo anti -VPPA marcado con FITC pretitulado previamente.
4. Incubar en cámara húmeda a 37° durante 30 minutos.
5. Lavar con PBS durante 10 minutos.
6. Añadir glicerina tamponada pH 8.
7. Visualizar en microscopio de fluorescencia.

- **INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.**

La fluorescencia aparece en los cuerpos de inclusión en el citoplasma de las células infectadas. Cuando son tiempos tardíos de infección la fluorescencia parece de forma más granular.



REFERENCIAS

- Bool P.H., Ordás A. y Sánchez-Botija C. (1969). "Diagnóstico de la Peste Porcina Africana por fluorescencia". Bull.off.inter.Epiz. (72); 819-839.
- Bool P.H., Ordás A. y Sánchez-Botija C. (1970). "Le diagnostic par immunofluorescence de la Peste Porcina Africaine". Rvta. Patron. Biol. Anim. (11,2); 115-132.

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*.

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