



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA PPA: IFI (INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA)

• INTRODUCCIÓN

La IFI es un método de diagnóstico serológico donde se combinan la sensibilidad de las técnicas histológicas y la especificidad de las técnicas inmunoenzimáticas.

Fue adaptada para la detección de anticuerpos de PPA por Bool et al. en 1961 y más tarde fue aplicada para el diagnóstico de rutina de la enfermedad por Sánchez-Botija et al. en 1970 .

La técnica está basada en la utilización de conjugados marcados con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) que poseen tanto actividad inmunológica como fluorescente. Como conjugado se puede utilizar un suero anti Ig-G de cerdo o bien proteína A marcada con FITC. Se ha descrito que usando proteína A se obtienen menos fondos inespecíficos.

• MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS.

- Cámaras de cultivo Lab-tek con cultivo en monocapa de células MS (Monkey Stable) confluentes en un 70% infectadas con VPPA (E70 adaptado MS)
- Suero positivo y negativo del VPPA como controles de la técnica.
- Conjugado anti Ig-G de cerdo o proteína A marcado con fluoresceína.
- Tampón carbonato/bicarbonato 0.5M pH9
- Glicerina tamponada
- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7.2
- Portaobjetos
- Microscopio de fluorescencia.

Tampón Carbonato/bicarbonato 0,5M pH 9_.

Na HCO ₃	3.7 g
Na ₂ CO ₃	0.6 g
Agua destilada	100 ml



Glicerina tamponada pH 8

Añadir dos volúmenes de glicerina más 1 volumen de tampón carbonato/bicarbonato 0.5M pH9

Tampón salino PBS pH 7.2_

Na Cl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	2.9 g
KCl	0.2 g
Agua destilada a	1000 ml

Ajustar el pH antes de usar. Conservar a 4°.

• METODOLOGÍA

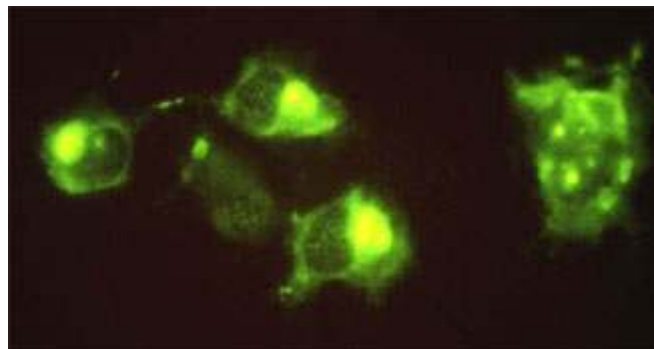
1. Sobre cada pocillo de la cámara Lab-tek añadir la muestra problema y los sueros control diluidos al 1/30 en PBS pH 7.2 en cantidad suficiente para cubrir todo el tapiz celular. Incubar 30 min. en cámara húmeda a 37°C.
2. Lavar la cámara Lab-tek 2 veces durante 5 minutos por lavado con PBS pH 7.2. De este modo se eliminan las inmunoglobulinas no fijadas o deficientemente fijadas.
3. Sobre cada pocillo de la cámara Lab-tek añadir el conjugado-FITC a la dilución óptima en PBS pH 7.2 en cantidad suficiente para cubrir todo el tapiz celular. Incubar 30 min. en cámara húmeda a 37°C.
4. Lavar la cámara Lab-tek 2 veces durante 5 minutos por lavado con PBS pH 7.2. Realizar un último lavado de 30-40 segundos en agua destilada



5. Secar la cámara cuidadosamente y se monta el portaobjetos añadiendo glicerina tamponada o Fluoprep (Bio-Merieux 75521). Analizar los resultados utilizando un microscopio de fluorescencia.

• INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

En el caso del suero control positivo sobre el tapiz celular se localizan fluorescencias en determinados puntos cercanos al núcleo. Estos serían los centros replicativos del VPPA. La fluorescencia nos indicará que la reacción entre el complejo antígeno-anticuerpo y el conjugado-FITC ha tenido lugar. Sin embargo, en el caso del suero control negativo, las células aparecerán libres de fluorescencia. Los sueros problema se clasificarán como positivos o negativos referidos a los controles. La lectura por tanto es subjetiva.





REFERENCIAS

- Bool, P.M., Ordás, A., Sánchez-Botija, C. (1969). Diagnosis of ASFV by immunofluorescence. Bull. off. Int. Epiz. 72, 819-839.
- Sánchez-Botija, C., Ordás, A. y González, J.C. (1970). Rev. Patron. Biol. Anim. 15(2). 159-180.

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/.

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