Reduca (Recursos Educativos).
Serie Congresos Alumnos. 6 (4): 69-75, 2014
ISSN: 1989-5003

Nuevo diagnóstico DIVA de peste equina africana

Carla Trobiani Gallegos. Diego Rodríguez Alepuz.

Grado en Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
carlatrobianigallegos@gmail.com

Tutores
Almudena Sánchez-Matamoros. José Manuel Sánchez-Vizcaíno.

Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
almudena@sanidadanimal.info jmvizcaino@ucm.es

Resumen: La peste equina africana es una de las enfermedades reemergentes vectoriales más importantes que pueden afectar a población equina europea, pudiendo causar un gran impacto socio-económico. Ante esta situación, la vacunación es la mejor estrategia para combatir la enfermedad, logrando su control y erradicación. Con este fin, en el brote de Península Ibérica (1987 – 1990) se utilizó la vacuna inactivada para el serotipo 4, además, esta vacuna permite la diferenciación de animales vacunados e infectados (DIVA) ya que no induce anticuerpos frente a una de las proteínas del virus (NS3). Esta peculiaridad y el desarrollo de pruebas de diagnóstico DIVA permitirán disminuir las limitaciones de movimientos tan importantes en los équidos. La plataforma Luminex nos proporciona un marco ideal para este tipo de diagnósticos, ya que con una sola prueba se realizará la identificación de ambas proteínas simultáneamente. Por ello, el objetivo de este estudio es desarrollar un ensayo Luminex múltiplex que permita la diferenciación de los animales infectados y vacunados/no infectados simultáneamente. Esta nueva metodología permitió la detección de anticuerpos frente a VP7 y NS3 con un 100% de sensibilidad y especificidad. Además, la evaluación de las muestras de animales vacunados con vacuna inactivada frente al serotipo 4 permitió comprobar la capacidad DIVA del ensayo. Esta metodología promete ser un método sensible y eficiente que permite la detección múltiplex de anticuerpos simultáneamente y con un ahorro de tiempo y costo para el laboratorio.

Palabras clave: Peste equina africana. Diagnóstico DIVA. Detección de anticuerpos. Serología.

INTRODUCCIÓN

La peste equina africana (PEA*)* es una enfermedad vírica vectorial infecciosa y no contagiosa de declaración obligatoria en la Organización Mundial de Sanidad Animal

(OIE) que afecta a los équidos provocando una alta mortalidad en caballos. El agente etiológico es un virus del cual se conocen 9 serotipos, perteneciente al género *Orbivirus*, al igual que el virus de la Lengua Azul[1]. La PEA es transmitida por mosquitos del género Culicoides, siendo endémica en África Subsahariana[2]. Sin embargo, brotes esporádicos se han notificado fuera de la zona endémica, como el norte de África, Europa (España y Portugal) y Asia, necesitando intensas campañas de vacunación y sacrificio para erradicar la enfermedad[2]. Actualmente, debido al cambio climático y la re-emergencia de enfermedades transmitidas por el mismo vector en Europa (Lengua Azul y Scmallenberg) ha incrementado la preocupación por la re-introducción y difusión de la PEA en los países europeos[3]. Por estas razones, la PEA es una enfermedad muy importante para todo el sector equino y su entrada en un país libre provocaría consecuencias devastadoras por su gran impacto económico y sanitario.

La entrada de la PEA en un país supone el cierre de fronteras con importantes restricciones al comercio internacional. Por ello, en países no endémicos, se necesitan adecuadas medidas de control y erradicación de la enfermedad. La vacunación es una de las principales herramientas para conseguirlo. Con este fin, se utilizó una vacuna inactivada frente al serotipo 4 en el brote que hubo en la Península Ibérica (1987 – 1990) [4]. Además, esta vacuna tiene la característica de permitir diferenciar animales vacunados e infectados (DIVA), ya que no induce anticuerpos frente a la NS3 [5,6]. Por ello, el desarrollo de ensayos DIVA son de gran utilidad para permitir la movilidad de animales vacunados en áreas donde esté presente la enfermedad, y reducir las restricciones comerciales.

Diferentes técnicas serológicas han sido utilizadas para la detección de anticuerpos de PEA como la fijación del complemento, neutralización del virus o el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) [1]. Sin embargo, estas técnicas no permiten realizar el estudio simultáneo de varios anticuerpos frente a distintas proteínas. La técnica Luminex es una nueva herramienta de diagnóstico que permite realizar ensayos de diagnóstico múltiplex en una sola reacción basándose en la diferenciación de microesferas marcadas con un único espectro. Estas microesferas se pueden unir a proteínas que serán reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero permitiendo su cuantificación por un fluoróforo [7]. Por ello, el objetivo de este estudio consiste en el desarrollo de un ensayo Luminex múltiplex que permita la diferenciación de animales infectados y vacunados/no infectados simultáneamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras analizadas

En este ensayo se han evaluado 56 muestras de suero que se obtuvieron de una infección experimental con PEA del serotipo 4 realizada en un laboratorio de nivel de Bioseguridad 3 (Zoetis Olot SLU) de acuerdo con la normativa de bienestar animal vigente (Directiva 2010/63/UE). Trece caballos sanos fueron infectados con el serotipo

de PEA, usando 1 caballo como control negativo. La toma de muestras se realizó de manera semanal. Además se procesaron 13 muestras de animales vacunados con una vacuna inactivada frente al serotipo 4.

Producción de proteínas

La proteína recombinante VP7 fue proporcionada por INGENASA, mientras que la proteína recombinante NS3 fue producida y purificada en nuestro laboratorio según el protocolo modificado de Laviada et al. 1995[6].

Acoplamiento de las proteínas a las microesferas paramagnéticas

Un total de 5 µg del recombinante VP7 y NS3 se conjugaron de manera covalente a los grupos carboxilo libres de las microesferas (región de 37 y 43, Bio-Rad) usando el kit de acoplamiento comercial Bio-Plex® Amine Coupling Kit (Bio-Rad). El protocolo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayo Luminex con las microesferas unidas a las proteínas VP7 y NS3

Para realizar el ensayo se prepararon diluciones 1/100 de las muestras de suero en tampón de dilución (PBS con 10% suero de cabra y 0,02% Tween). En placas de 96 pocillos (Bio-Plex Pro™ flat bottom plates), se añadieron una concentración de 1250 microesferas/pocillo de cada proteína (25 microesferas/µl). Posteriormente, se añadieron 50 µl de las diluciones de los sueros. Tras la incubación de la placa durante 30 minutos en agitación y oscuridad, se lavó tres veces la placa con 200µl de tampón de lavado (PBS con 0,05% Tween) en un lavador magnético. A continuación, se añadieron 50µl de una dilución 1/2000 de un anticuerpo anti-IgG de caballo biotinilado (Jackson ImmunoResearch Inc) en tampón de dilución como anticuerpo secundario. Tras 30 minutos de incubación y tres lavados, se añadieron 50µl de 1/100 de estreptavidina marcada con R-ficoeritrina (Quiagen). Este reactivo se une a la fracción biotilinada del anticuerpo secundario, actuando como fluoróforo. La placa se incubó 15 minutos y se realizaron tres lavados, para re-suspender las microesferas en 125 µl de tampón de suspensión (Bio-Rad) y realizar el análisis usando el sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad).

Antes del análisis se realizó el correcto calibrado del dispositivo mediante los kits de calibración Bio-Plex (Bio-Rad). Luminex fundamenta este análisis en la citometría de flujo. Así, cada microesfera unida a su correspondiente proteína (NS3 o VP7) fue examinada individualmente por dos láseres, uno rojo que analizó la microesfera y uno verde, que examinó el fluoróforo. Para el análisis de los datos, la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) del fluoróforo fue estimada por la lectura de al menos 50 microesferas. Los resultados del MFI se corrigieron restando la señal de antígeno negativo de la señal de antígeno positivo.

Análisis de datos

El programa informático MedCalc (versión 9.5.2.0; MedCalc Software) su utilizó para determinar el *cut-off* del ensayo Luminex para cada una de las proteínas, maximizando la sensibilidad y especificidad de la técnica de diagnóstico. La capacidad de la prueba de Luminex para discriminar entre muestras positivas y negativas (sensibilidad y especificidad) se evaluó mediante análisis ROC.

RESULTADOS

Para evaluar la producción de anticuerpos frente a las proteínas VP7 y NS3 de la PEA de serotipo 4 mediante el ensayo Luminex desarrollado, se evaluaron 69 muestras, de las cuales 56 proceden de una infección experimental con el serotipo 4 y 13 son muestras de animales vacunados con vacuna inactivada frente al serotipo 4. Para determinar el *cut-off* de la técnica para cada una de las proteínas, se analizaron los resultados de las muestras de suero tomadas el día 0 y del control negativo (17 muestras verdaderos negativos (VN)) y las muestras obtenidas el día 21 post-infección (13 muestras verdaderos positivos (VP)). Los resultados se analizaron con la curva ROC. Los valores de *cut-off* de las proteínas VP7 y NS3 fueron de 548 MFI y 368,5 MFI respectivamente, con una sensibilidad y especificidad del 100%.

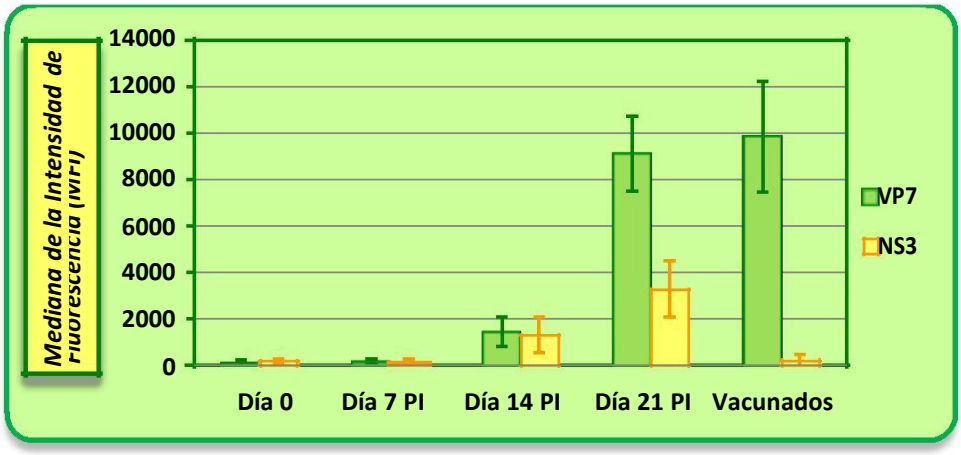

Figura 1. En el gráfico se muestra la media con su desviación estándar, de la mediana de la fluorescencia de cada una de las dos proteínas en los diferentes días de análisis post-infección (PI) y en los animales vacunados con vacuna inactivada frente al serotipo 4.

Posteriormente se evaluaron el resto de muestras de los animales infectados experimentalmente para establecer la cinética de respuesta inmune humoral frente a ambas proteínas. Mediante este test se detectó la presencia de anticuerpos frente a ambas proteínas (VP7 y NS3) a los 14 días post-infección (Fig 1).

Con la incorporación de las muestras de animales vacunados con vacuna inactivada, se recalcularon los *cut-off* para ambas proteínas. Para la VP7 se evaluaron 17 VN y 26 VP obteniendo el mismo *cut-off* que en el estudio anterior. Para la NS3 se evaluaron 30 VN y 13 VP obteniendo un *cut-off* de superior al determinado anteriormente, 805 MFI. Estos valores permitían obtener una sensibilidad y especificidad del 100% para ambas proteínas. Usando estos parámetros, los animales vacunados mediante vacunas inactivadas frente al serotipo 4 dieron valores positivos frente a la proteína VP7 pero no para la NS3 (Fig.1).

DISCUSIÓN

En este trabajo ha sido desarrollado el primer ensayo Luminex para el diagnóstico de PEA que permite la diferenciación de animales infectados, vacunados con vacuna inactivada frente al serotipo 4 y no infectados simultáneamente con un 100% de sensibilidad y especificidad. Es un desarrollo de gran utilidad ya que podría permitir la diferenciación de animales vacunados con vacuna inactivada frente al serotipo 4 y reducir las restricciones comerciales, tan importantes en el sector equino por asuntos de competición o compra-venta, así como las consecuencias económicas asociadas a la enfermedad.

Este DIVA Luminex ha permitido la evaluación simultánea de anticuerpos frente a dos proteínas del virus. La VP7 ha sido seleccionada por ser la proteína más conservada en todos los serotipos del virus, y por ello proteína diana en la mayoría de los test de diagnóstico de la enfermedad [1]. La NS3 ha sido seleccionada por su capacidad DIVA con la vacuna inactivada [5,6]. Al realizar el estudio simultáneo de anticuerpos frente a ambas proteínas se observó que, aunque se detectan niveles elevados de anticuerpos frente a ambas, hay una mayor fluorescencia de respuesta frente a la VP7 que a la NS3 en animales infectados, aunque la cantidad de proteína unida con las microesferas es la misma. Esto puede ser debido a que la proteína NS3, al ser una proteína no estructural, origina en menor producción de anticuerpos en el caballo infectado. A pesar de estas diferencias, la respuesta a anticuerpos frente a ambas proteínas se observa a los 14 días post-infección. Este resultado se corresponde con los datos descritos en la literatura de producción de anticuerpos entre los 8 y 12 días post-infección [1].

Hasta ahora, las técnicas diagnósticas para la detección de anticuerpos frente a la PEA más utilizadas son los ELISAs [1,6]. Esta técnica también permite detectar la presencia de anticuerpos frente a diferentes proteínas, pero es necesario realizar mayor número de ensayos para obtener los mismos resultados. Luminex resuelve esta desventaja, ya que permite realizar ensayos múltiplex simultáneamente, reduciendo el número de test necesarios a realizar, el volumen de muestra, el trabajo y el tiempo necesarios [7].

Este ensayo Luminex ha permitido la diferenciación de animales infectados, vacunados con vacuna inactivada frente al serotipo 4 y no infectados. Sin embargo, el número de muestras evaluadas ha sido muy limitado. Por ello, sería conveniente ampliar el número de muestras incluyendo muestras de animales de zonas libres de PEA y de animales infectados en condiciones de campo para mejorar la validación de la técnica.

CONCLUSIONES

El ensayo DIVA Luminex con las proteínas NS3 y VP7 de la peste equina africana permite ser una prueba rápida, específica y sensible para la diferenciación de animales infectados, vacunados, con vacuna inactivada frente al serotipo 4, y no infectados simultáneamente. Además ha permitido la evaluación simultánea de la respuesta cinética humoral frente a las dos proteínas del virus en una infección experimental, detectándose la VP7 como más inmunógena, aunque observándose la producción de anticuerpos de ambas a los 14 días post-infección. Sin embargo, se necesitarán más estudios para validar el ensayo DIVA Luminex.

BIBLIOGRAFÍA

1. OIE. Peste Equina Africana. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2012; Capítulo 2.1.11.

2. Mellor PS, Hamblin C. African horse sickness. Veterinary Research. 2004; 35, (4): 445 - 466.

3. MacLachlan NJ, Guthrie AJ. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other Orbivirus diseases. Veterinary Research. 2010; 41 (6): 12.

4. Sánchez-Vizcaíno JM. Control and eradication of African horse sickness with vaccine. Dev Biol (Basel) 2004; 119:255-8.

5. Laviada MD, Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM. Characterization of African horsesickness virus serotype 4-induced polypeptides in Vero cells and their reactivity in Western immunoblotting. The Journal of General Virology. 1993; 74 (1):81-87.

6. Laviada MD, Roy P, Sánchez-Vizcaíno JM, Casal JI. The use of African horse sickness virus NS3 protein, expressed in bacteria, as a marker to differentiate infected from vaccinated horses. Elsevier. 1995; 38 (2–3): 205–218.

7. Christopher-Hennings J, Araujo KPC, Souza CJH, Fang Y, Lawson S, Nelson EA, Clement T, Dunn M, Lunney JK. Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2013; 25 (6): 671-691.

Recibido: 17 marzo 2014.
Aceptado: 26 abril 2014.