

## Desarrollo de un ELISA indirecto para la detección de inmunoglobulinas específicas frente al virus de la Peste porcina africana en fluido oral

**Cristina Jurado Díaz**

Licenciatura en Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.  
[cjdiaz@estumail.ucm.es](mailto:cjdiaz@estumail.ucm.es)

### Tutores

**Lina Mur. Belén Rivera. José Manuel Sánchez-Vizcaíno.**

Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid  
[Linamur@vet.ucm.es](mailto:Linamur@vet.ucm.es)

**Resumen:** La Peste porcina africana es una enfermedad vírica muy importante en el sector porcino ya que produce elevadas tasas de mortalidad y ocasiona el cierre de mercados internacionales. Este trabajo se centra en el desarrollo de un ELISA, utilizando la proteína p72 como antígeno, para la detección de inmunoglobulinas IgG en fluido oral. Para ello se realizó un estudio experimental con cerdos inoculados con las cepas NHV y Armenia del virus de la Peste porcina africana.

**Palabras clave:** peste porcina africana. Diagnóstico. Anticuerpos en fluido oral.

## INTRODUCCIÓN

La Peste porcina africana (PPA) es una de las enfermedades más importantes de la especie porcina. Está causada por un virus DNA perteneciente a la familia *Asfviridae*, siendo el único miembro de esta familia <sup>(1)</sup>. La PPA afecta tanto al cerdo doméstico como silvestre, y se transmite tanto de forma directa por secreciones de animales infectados (especialmente sangre), como indirecta por medio de cualquier tipo de material y/o comida, donde resiste por grandes periodos de tiempo. Además, en su ciclo epidemiológico interviene una garrapata blanda, del género *Ornithodoros*, capaz de transmitir la enfermedad.

La PPA es endémica de un gran número de países del continente africano y la isla de Cerdeña, Italia, donde permanece presente desde 1978. En el año 2007 se produjo su introducción en el este de Europa, en Georgia, desde donde la enfermedad se ha ido difundiendo con rapidez, afectando a un gran territorio de Rusia <sup>(2)</sup>. Desde 2011, los focos de PPA se han ido produciendo en países aledaños como Bielorrusia y Ucrania, hasta que recientemente, se detectaron casos de jabalíes afectados en países

miembros de la Unión Europea como Lituania y Polonia (Figura 1) <sup>(3)</sup>. La aparición de múltiples brotes en zonas geográficamente distantes evidencia la constante/rápida diseminación del virus y las dificultades que esto supone para el control y erradicación de la enfermedad.



**Figura 1: Distribución de los focos de peste porcina africana en los países del este de Europa y Rusia desde 2007 hasta el 3 marzo 2014 (Fuente OIE, elaboración propia).**

La PPA supone un gran impacto económico por la elevada tasa de mortalidad que produce y las restricciones de exportación en el comercio internacional para el país que la sufre. A esto hay que unirle la falta de una vacuna eficaz. Por todo ello, la prevención y control de la enfermedad están basados en la implementación de adecuados planes de vigilancia y control. Dentro de estos planes, los estudios serológicos han demostrado su importancia y eficacia para la detección de portadores y animales infectados <sup>(4)</sup>.

Tradicionalmente la muestra empleada para el diagnóstico serológico de la enfermedad era el suero, en el que además de anticuerpos podemos encontrar también virus. Sin embargo, esta presenta varias desventajas debido a las elevadas concentraciones de virus en sangre, lo que implica un riesgo de difusión, la necesidad de manejo de los animales, y el coste del servicio veterinario para realizar el muestreo. Estudios anteriores han demostrado que el fluido oral es una alternativa prometedora para la realización de estudios de vigilancia en poblaciones porcinas <sup>(5)</sup>. De hecho, se ha demostrado ampliamente su utilidad y eficacia como muestra en la detección de patógenos y anticuerpos porcinos frente al virus del síndrome respiratorio reproductor porcino y el circovirus porcino tipo 2 <sup>(6)</sup>, e incluso frente al virus de la PPA <sup>(7)</sup>. No obstante los ensayos anteriores realizados para PPA demostraban un cierto retraso en

la detección de anticuerpos en FO respecto a las muestras de suero.

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de una técnica de ELISA indirecto basado en la proteína p72 del virus de la PPA para la detección de inmunoglobulinas específicas en muestras de fluido oral, que nos permita alcanzar niveles de detección similares al suero.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Obtención/Colección de muestras**

Para ello, se realizó un experimento con nueve cerdos, a los que se inocularon con una cepa atenuada del virus de la PPA (NHV), que ocasiona el desarrollo de una forma subaguda de la enfermedad. Los cerdos supervivientes, al día 47 postinfección (pi) fueron desafiados con una cepa virulenta del virus (Armenia 07). Los inóculos del aislado NHV fueron preparados de manera diferente, por lo que se distinguen tres grupos de cerdos: i) c1 al c5 fueron inoculados con NHV cultivado en células COS; ii) los cerdos 6 y 7 fueron: inoculados con NHV cultivado en macrófagos alveolares porcinos (MAP) sin adyuvante; iii) mientras que los cerdos 8 y 9 fueron con NHV cultivado en MAP con adyuvante. A estos animales se les extrajo en diferentes momentos pi sangre para la obtención de suero y fluido oral, mediante el protocolo descrito por Mur et al., 2013.

### **Técnicas de diagnóstico o Análisis de las muestras**

Las muestras de suero fueron analizadas por un ELISA de competición comercial basado en la p72 (ELISA PPA COMPACT INGENSA®), según las instrucciones del fabricante.

Las muestras de fluido oral fueron analizadas mediante el ELISA indirecto vp 72 partiendo de la proteína vp72 del virus proporcionada por INGENASA. Se ensayaron distintas condiciones para optimizar su funcionamiento, variando concentración del antígeno, tipo de conjugado (proteína A, proteína G, anticuerpo Anti Ig-G), concentraciones de conjugado, concentraciones de fluido oral y tiempos de incubación. El conjugado finalmente seleccionado para el ensayo fue el anti-cerdo IgG producido por JACKSON® a la concentración 1:25000 y el sustrato, el TMB (tetrametilbenzimidazina) producido por INGENASA.

## **RESULTADOS**

### **Optimización del ensayo**

Tras múltiples ensayos, modificando todos los parámetros anteriormente mencionados, se seleccionó el protocolo que optimizaba el ratio entre muestras

positivas y negativas, proporcionándonos una mayor discriminación. El protocolo final seleccionado emplea la proteína p72 producida por INGENASA a la concentración de 1 µg/pocillo. El fluido oral se utilizó a una dilución 1:2 en volumen final 100 µl. El antígeno se incubó durante 1 hora a 37 °C en contacto con el fluido oral. Tras la incubación realizamos tres lavados y adicionamos 100 µl de la dilución de conjugado (anti-cerdo IgG (JACKSON ®) a 1:25000, incubándose el conjugado a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se realizan tres lavados más y adicionamos el sustrato TMB sin dilución. Pasados cinco minutos se detiene la reacción con la solución STOP de y procedemos a la lectura de densidades ópticas a 450 nm.

### Análisis de las muestras experimentales

Tras analizar las muestras de suero y de acuerdo a las densidades ópticas obtenidas, podemos afirmar que los cerdos 4, 5, 6 y 7 eran positivos a la infección el día 6 pi mientras que los cerdos 1, 2, 3, 8 y 9 eran dudosos el día 6 pi y positivos a la infección el día 12 pi.

Las densidades ópticas obtenidas en el análisis de las muestras de fluido oral mediante el protocolo experimental, se muestran en la Figura 2, donde se pueden observar comportamientos similares en las cinéticas de anticuerpos de los cerdos que fueron inoculados con los mismos tipos de virus. De hecho, los cerdos numerados del 1 al 5 presentaron un comportamiento casi idéntico, siendo la máxima desviación observada de 0,06 entre el cerdo 3 y el cerdo 1 el día 0 pi. Por ello, para este grupo de cerdos (C1 al C5) se representó la media de los valores como único valor.

En el caso del fluido oral, el día 12 pi todos los cerdos mostraron resultados positivos, excepto el cerdo 7 considerado positivo al día 6 pi, y el cerdo 6 que mostró un resultado dudoso. La media de las densidades ópticas de los cerdos positivos el día 12 pi es 0,544; mientras que el cerdo 6 ese mismo día presentó una densidad óptica de 0,287, resultado por lo tanto dudoso. La media de las densidades ópticas de las muestras negativas (todos los cerdos antes de la inoculación fue de 0,151).

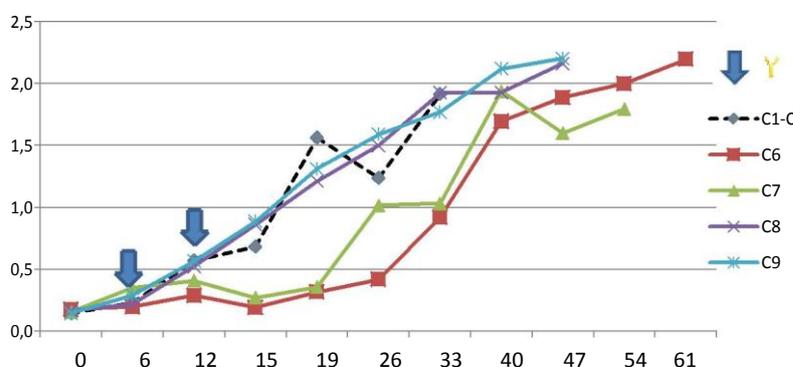


Figura 2. Representación de las densidades ópticas de los fluidos orales a los distintos días pi obtenidos por el protocolo experimental empleando la proteína vp72 del virus de la PPA.

## DISCUSIÓN

El presente estudio muestra el desarrollo y optimización de una técnica de ELISA basada en la proteína p72 para la detección de anticuerpos frente al virus de la PPA en fluido oral. Si bien esta no es la primera vez que se demuestra la utilidad de este tipo de muestra para la detección de la PPA, el presente ensayo muestra considerables ventajas respecto al ensayo anteriormente publicado.

En primer lugar, nos permite mejorar los tiempos de detección, alcanzando niveles muy similares al suero. A su vez, este ELISA presenta una serie de ventajas prácticas entre las que destaca la posibilidad de reducir la cantidad de muestra necesaria, los tiempos más cortos de incubación (el anterior ensayo presenta una incubación nocturna retrasando el diagnóstico de la muestra), el uso de un sustrato comercial y además, la producción de antígeno no es necesario realizarla en condiciones de alta bioseguridad. Por todo ello, el empleo de la proteína vp72 del virus supone un claro avance en el campo diagnóstico de la peste porcina africana.

A la vista de los resultados obtenidos queda demostrada la capacidad diagnóstica de la proteína p72 para el diagnóstico serológico de la PPA en fluido oral y su excelente correlación con los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras de suero. El uso de fluido oral supone una gran ventaja ya que nos evita trabajar en condiciones de alta bioseguridad y al mismo tiempo nos proporciona unos resultados muy similares a los del suero.

## AGRADECIMIENTOS

Al equipo del CISA-INIA por permitirnos llevar a cabo el estudio experimental en sus instalaciones y a INGENASA por facilitarnos la proteína p72.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Dixon L.K, Escribano J.M, Martins C, Rock D.L, Salas M.L, Wilkinson P.J, 2005. Asfarviridae. In: Fauquet C.M, Mayo M.A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L.A, (Eds.), Eighth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, London, pp. 135-143.
2. Sanchez-Vizcaino J.M, Mur L, Martinez-Lopez B, 2012. African Swine Fever: An Epidemiological Update. *Transbound. Emerg. Dis.* 59s1, 17-35.
3. OIE, 2012. African swine fever. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2012. Office International des Epizooties, Paris, France. Chapter 2.8.1.

4. Arias M, Sánchez-Vizcaíno J.M., 2002. African swine fever eradication: The Spanish model, in: Morilla A, Jin K. and J. Zimmerman (Eds), Trends in Emerging Viral Infections of Swine, 1st edn. Iowa State University Press, Iowa, United States of America. pp. 133-139
5. Ramirez A, Wang C, Prickett J.R, Pogranichniy R, Yoon K.-J, Main R, Rademacher C, Hoogland M, Hoffmann P, Johnson J.K, Kurtz A, Kurtz E, Zimmerman J, 2012. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev. Vet. Med.* 104, 292–300.
6. Prickett J.R, Johnson J, Murtaugh M.P, Puvanendiran S, Wang C, Zimmerman J.J, Opriessnig T, 2011. Prolonged detection of PCV2 and anti-PCV2 antibody in oral fluids following experimental inoculation. *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 121–127.
7. Mur L, Gallardo C, Soler A, Zimmermman J, Pelayo V, Nieto R, Sánchez-Vizcaíno J.M, Arias M. Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. *Veterinary microbiology.* 2013; 165:135-139

Recibido: 17 marzo 2014.

Aceptado: 26 abril 2014.