

## SECCIÓN 3.8.

### SUIDAE

---

#### CAPÍTULO 3.8.1.

## PESTE PORCINA AFRICANA (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA)

### RESUMEN

*La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad infecciosa de los cerdos domésticos y salvajes de todas las razas y edades causada por el virus de la PPA (VPPA). Los síndromes clínicos varían desde hiperagudos hasta agudos, subagudos o crónicos, en función de la virulencia del virus. La enfermedad aguda se caracteriza por fiebre elevada, hemorragias en el sistema reticuloendotelial y una mortalidad alta. Se ha observado que determinadas garrapatas blandas del género Ornithodoros, en concreto O. moubata y O. erraticus, son reservorios y vectores de transmisión del VPPA. El virus está presente en las glándulas salivares de las garrapatas y transmite a nuevos hospedadores (suidos domésticos o salvajes) cuando estas se alimentan. Se puede transmitir por vía sexual entre garrapatas, por vía transovárica a los huevos o por vía transestadial a lo largo de toda la vida de la garrapata.*

*El VPPA es el único miembro de la familia Asfarviridae, género Asfivirus.*

*Los procedimientos de laboratorio para el diagnóstico se clasifican en dos grupos: detección del virus y serología. La elección de las pruebas que se han de realizar en función de la situación de la enfermedad y de la capacidad de diagnóstico del laboratorio en la zona o país.*

**Identificación del agente:** *El diagnóstico de laboratorio debe enfocarse al aislamiento del virus mediante la inoculación de leucocitos de cerdo o cultivos de médula ósea, la detección del antígeno en hisopos o cortes de tejidos congelados por la prueba de la inmunofluorescencia directa y/o la detección del ADN genómico por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una PCR en tiempo real. Las PCR son unas técnicas excelentes, muy sensibles y específicas, rápidas para la detección del VPPA y muy útiles en muchas circunstancias. Es especialmente útil si los tejidos no son los apropiados para el aislamiento del virus y la detección del antígeno.*

*En casos dudosos, el material se pasa en cultivos celulares de leucocitos y se repiten los procedimientos descritos anteriormente.*

**Pruebas serológicas:** *Los cerdos que sobreviven a la infección natural generalmente desarrollan anticuerpos contra VPPA 7–10 días después de la infección, y estos anticuerpos persisten durante largos períodos de tiempo. Cuando la enfermedad es endémica o cuando un brote inicial está causado por una cepa de baja o moderada virulencia, la investigación de nuevos brotes debe incluir la detección de anticuerpos específicos en el suero o en los extractos de los tejidos enviados. Para la detección de anticuerpos, se dispone de varios métodos, como el ensayo inmunoanálisis (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFA), la prueba de la inmunoperoxidasa indirecta (IPT) y la prueba de la inmunotransferencia (IBT).*

**Requisitos para las vacunas:** *Actualmente no existe vacuna para la PPA.*

## A. INTRODUCCIÓN

La distribución actual de la peste porcina africana (PPA) abarca más de 50 países de tres continentes (África, Asia y Europa); la enfermedad fue introducida en Georgia, lugar desde el cual se propagó a países vecinos, como Rusia. Desde ahí, la PPA se distribuyó hasta países de Europa del este y se extendió hacia occidente alcanzando la Unión Europea en 2014. Desde entonces, se ha seguido propagando por Europa hacia occidente y hacia el sur. En todos estos países, ambos hospedadores (el cerdo doméstico y el jabalí) han resultado afectados por la enfermedad. En agosto de 2018, la República Popular de China notificó su primer brote de PPA, y a continuación se propagó por Asia.

El virus de la PPA (VPPA) es un virus de ADN con envoltura grande y complejo, de morfología icosaédrica. Actualmente, está clasificado como miembro único de la familia *Asfviridae*, género *Asfivirus* (Dixon *et al.*, 2005). Se han identificado más de 60 proteínas estructurales en partículas víricas intracelulares (200 nm) (Alejo *et al.*, 2018). Se han identificado más de cien proteínas asociadas a infección en macrófagos porcinos infectados, y al menos 50 de estas reaccionan con sueros de cerdos infectados o recuperados (Sánchez-Vizcaíno & Arias, 2012). El genoma del VPPA, de ADN lineal bicatenario, comprende entre 170 y 193 kilobases (kb) y contiene entre 150 y 167 marcos abiertos de lectura con una región central conservada de unas 125 kb y terminaciones variables. Estas regiones variables codifican 5 familias de multigenes que contribuyen a la variabilidad del genoma del virus. Se ha secuenciado todo el genoma de varias cepas de VPPA (Bishop *et al.*, 2015; Chapman *et al.*, 2011; De Villiers *et al.*, 2010; Portugal *et al.*, 2015). Diferentes cepas de VPPA difieren en su capacidad para causar enfermedad, pero actualmente sólo hay un serotipo reconocido del virus detectable mediante las pruebas de anticuerpos.

La epidemiología molecular de la enfermedad se investiga por secuenciación del extremo 3' terminal del marco abierto de lectura B646L que codifica la proteína principal de la cápsida p72, lo cual permite diferenciar hasta 24 genotipos distintos (Achenbach *et al.*, 2017; Boshoff *et al.*, 2007; Quembo *et al.* 2018). Con el fin de distinguir subgrupos entre distintos VPPA estrechamente relacionados, se lleva a cabo un análisis de las secuencias de repetición en tándem (TRS) situadas en la región variable central (CVR) del gen B602L (Gallardo *et al.*, 2009; Lubisi *et al.*, 2005; Nix *et al.*, 2006) y en la región intergénica entre los genes I73R e I329L, en el extremo derecho del genoma (Gallardo *et al.*, 2014). Se ha comprobado que otras regiones génicas, como la E183L, que codifica la proteína o54, la CP204L, que codifica la proteína p30, y la proteína codificada por el gen EP402R (CD2v), constituyen herramientas útiles para determinar la presencia del VPPA de distintos lugares y, a partir de ahí, rastrear la propagación del virus.

Los virus de la PPA producen una serie de síndromes que oscilan entre la enfermedad sobreaguda y aguda y la crónica, así como infecciones subclínicas. Los cerdos son la única especie de animales domésticos que resulta infectada de forma natural por el VPPA. Los jabalíes y los cerdos salvajes también son susceptibles a esta enfermedad, mostrando signos clínicos y tasas de mortalidad similares a las observadas en cerdos domésticos. Por el contrario, los cerdos salvajes de África, tales como el jabalí africano facóquero (*Phacochoerus aethiopicus*), el potamoquero (*Potamochoerus porcus*) y el cerdo gigante de bosque (*Hylochoerus meinertzhageni*), son resistentes a la enfermedad y muestran pocos o ningún signo clínico. Estas especies de cerdos salvajes actúan como reservorios del VPPA en África (Costard *et al.*, 2013; Sánchez-Vizcaíno, *et al.*, 2015).

El período de incubación es, por lo general, de 4–19 días. Las cepas más virulentas producen una enfermedad hemorrágica sobreaguda o aguda caracterizada por fiebre elevada, pérdida de apetito, hemorragias cutáneas y de los órganos internos, y muerte a los 4–10 días, algunas veces incluso antes de que se observen los primeros signos clínicos. Las tasas de mortalidad pueden alcanzar el 100%. Las cepas menos virulentas producen signos clínicos leves – fiebre ligera, reducción del apetito y decaimiento – que pueden confundirse fácilmente con muchos otros trastornos de los cerdos y no llevar a la sospecha de PPA. Las cepas avirulentas y no hemadsorbentes pueden causar una infección subclínica no hemorrágica y seroconversión, pero algunos animales pueden desarrollar lesiones delimitadas en los pulmones o en la piel en áreas con salientes óseos y otras zonas susceptibles a los traumatismos.

La PPA no puede distinguirse de la peste porcina clásica (PPC) ni mediante la exploración física y mediante el examen postmortem, y ambas enfermedades deben tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial de cualquier síndrome febril agudo y hemorrágico en el cerdo. Las septicemias bacterianas también pueden confundirse con la PPA y la PPC. Para distinguir entre estas enfermedades son esenciales las pruebas de laboratorio.

En países libres de PPA donde se sospecha su presencia, el diagnóstico de laboratorio debe dirigirse al aislamiento del virus realizando una inoculación de cultivos de leucocitos o médula ósea de cerdo, la detección del ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la detección del antígeno en hisopos o cortes de tejidos congelados por la prueba de la inmunofluorescencia directa (FAT). Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más sensible y permite detectar ADN de VPPA desde estadios muy tempranos de la infección en tejidos y en muestras de sangre y suero tomadas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La PCR es especialmente útil si las muestras enviadas no son adecuadas para

el aislamiento del virus y la detección de antígeno debido a que han sufrido putrefacción. Los cerdos que se han recuperado de infecciones agudas, subagudas o crónicas generalmente exhiben una viremia durante varias semanas, haciendo de la PCR una herramienta muy útil para la detección de ADN del VPPA en cerdos infectados con cepas de virulencia baja o moderada. Se recomienda el aislamiento del virus mediante la inoculación de cultivos de leucocitos o de médula ósea de cerdos y la identificación por pruebas de hemadsorción (HAD) como pruebas confirmativas cuando la PPA da positivo en otros métodos, sobre todo cuando se trata de brotes primarios o de un caso de PPA.

Dado que no existen vacunas disponibles, la presencia de anticuerpos del VPPA es indicativa de una infección previa y, como los anticuerpos se producen desde la primera semana de la infección y persisten durante largos períodos, constituyen unos buenos marcadores para el diagnóstico de la enfermedad, sobre todo en las formas subagudas y crónicas.

Desde el punto de vista de la epidemiología, la PPA es compleja, con patrones de infección en África y Europa. La PPA tiene lugar por ciclos de transmisión en los que intervienen cerdos domésticos, jabalíes, suidos africanos salvajes y garrapatas blandas (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2015). En regiones donde están presentes las garrapatas blandas *Ornithodoros*, la detección del VPPA en estos reservorios de la infección contribuye a un mejor entendimiento de la epidemiología de la enfermedad. Esto es muy importante para establecer programas de control y de erradicación eficaces (Costard *et al.*, 2013).

La PPA no es una enfermedad zoonótica y no afecta a la salud pública (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2009).

El VPPA debe manipularse al nivel de biocontención adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo según lo establecido en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y biocontención: Norma para la gestión del riesgo biológico en los laboratorios veterinarios y en las instalaciones de los animales.*

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales concretos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos sospechosos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia en el rebaño/ manada	Determinar el estado inmunitario en animales concretos o en poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente</b>						
Aislamiento del virus/prueba HAD <sup>1</sup>	n/a	n/a	++	+++	++	n/a
FAT	n/a	n/a	++	++	+	n/a
ELISA para la detección de antígeno	+	++	+	+	+	n/a
PCR convencional	++	++	++	++	++	n/a
PCR en tiempo real	+++	+++	+++	+++	+++	n/a

1 Dado que ciertas cepas actuales del virus de la PPA no son hemadsorbentes, los resultados negativos en la HAD deben confirmarse mediante otras pruebas, como la PCR.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales concretos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos sospechosos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia en el rebaño/ manada	Determinar el estado inmunitario en animales concretos o en poblaciones tras la vacunación
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
ELISA	+++	+++	+++	+	+++	n/a
IPT*	+++	+++	+++	+	+++	n/a
IFAT*	+++	+++	+++	+	+++	n/a
IBT*	++	++	++	+	++	n/a

Clave: +++ = método recomendado, validado para este propósito; ++ = método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable.

HAD = hemadsorción; FAT= inmunofluorescencia; ELISA = enzimo-inmunoanálisis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; IPT= inmunoperoxidasa indirecta; IFAT = inmunofluorescencia indirecta; IBT = inmunotransferencia.

\*Método recomendado como prueba serológica confirmativa.

## 1. Identificación del agente

Cuando se sospecha de PPA, se deben enviar al laboratorio las siguientes muestras: sangre con anticoagulante (EDTA para PCR, heparina o EDTA para aislamiento del virus), suero y tejidos, principalmente bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, amígdalas, y riñón. Durante el transporte, estas muestras deben mantenerse tan frías como sea posible, pero sin congelarlas. Cuando llegan al laboratorio, si el proceso de análisis se retrasa, se guardan a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Como no siempre es posible mantener la cadena de frío, se pueden enviar las muestras en solución salina con glicerol; esto puede reducir ligeramente la probabilidad de aislar el virus, pero podría facilitar la llegada de los envíos al laboratorio para poder confirmar un brote.

### 1.1. Aislamiento del virus

#### 1.1.1. Preparación de la muestra

- i) Se preparan suspensiones de los tejidos triturando trozos de 0,5–1,0 g en un mortero con arena estéril y añadiendo 5–10 ml de una solución salina tamponada o medio de cultivo de tejidos que contenga antibióticos. Como alternativa, las muestras se pueden preparar poniendo los tejidos en tubos que contengan tampón o medio y perlas o esquiras estériles y homogeneizando a continuación con un homogeneizador.
- ii) Se clarifican las suspensiones mediante una centrifugación a 1.000 **g** durante 5 minutos. Se utiliza el sobrenadante para el aislamiento del virus.

### 1.2. Prueba de la hemadsorción

La prueba de la hemadsorción (HAD) (de León *et al.*, 2013) está basada en el hecho de que los eritrocitos porcinos se adhieren a la superficie de los monocitos o macrófagos porcinos que están infectados por el VPPA, y que la mayoría de cepas del virus tienen un fenotipo HAD. Un resultado positivo en las pruebas HAD es definitivo para el diagnóstico de la PPA. Se ha aislado un pequeño número de virus “no hemadsorbentes”, en gran parte atenuados o avirulentos, aunque algunos producen PPA aguda típica. La prueba se realiza inoculando sangre o una suspensión de tejidos de animales sospechosos a cultivos primarios de leucocitos preparados a partir de sangre de cerdos nunca antes infectados o en cultivos celulares de macrófagos alveolares. Es fundamental llevar a cabo todos los procedimientos de una forma tal que se impida la contaminación de los cultivos.

#### 1.2.1. Procedimiento analítico en cultivos primarios de leucocitos

- i) Se recoge el volumen necesario de sangre de cerdo fresca desfibrada.
- ii) Se centrifuga a 700 **g** durante 30 minutos y se recogen las células de la capa leucocitaria. Se añaden 3 volúmenes de cloruro de amonio al 0,83% a los leucocitos obtenidos. Se

mezcla e incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifuga a 650 **g** durante 15 minutos y se retira cuidadosamente el sobrenadante. Se lava el sedimento en un medio o en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

- iii) Se resuspenden las células a una concentración de  $10^6$ –  $10^7$  células/ml en un medio de cultivo de tejidos que contenga un 10–30% de suero porcino y antibióticos. Para evitar la hemadsorción inespecífica, el medio debe contener suero o plasma del mismo cerdo del que se obtienen los leucocitos. Si se analiza un gran volumen de muestras, los sueros homólogos pueden reemplazarse por un suero que se haya identificado como capaz de evitar la formación de auto-rosetas inespecíficas en un pre-análisis.
  - iv) Se distribuye la suspensión celular en placas de 96 pocillos con 200  $\mu$ l por pocillos (300.000 células/pocillo) y se incuba a 37°C en una incubadora humidificada y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Este procedimiento también se puede realizar en alícuotas de 1,5 ml en tubos de 160 x 16 mm, que se incuban inclinados (5–10° respecto a la horizontal) a 37°C.
- Nota:** Para el diagnóstico rutinario, solo los cultivos de 2–4 días son lo bastante sensibles.
- v) Pasados 3 días, se inoculan tres tubos o placas de pocillos añadiendo 0,2 ml/tubo o 0,02 ml (dilución final de 1/10)/por pocillo de muestras preparadas. Se aconseja inocular en los cultivos diluciones 1/10 y 1/100, y esto es particularmente importante cuando el material procedente del campo se encuentra en malas condiciones.
  - vi) Se inoculan cultivos control positivos con virus hemadsorbente. Son esenciales los controles negativos no inoculados para controlar la posibilidad de hemadsorción inespecífica.
  - vii) Se añade a cada tubo 0,2 ml de una preparación reciente de eritrocitos de cerdo al 1% en solución salina tamponada. En el caso de las placas de 96 pocillos, se añaden 0,02 ml de eritrocitos de cerdo al 1% por pocillo.
  - viii) Se examinan diariamente al microscopio los cultivos durante 7–10 días para comprobar si presentan efecto citopático (ECP) y hemadsorción.
  - ix) Lectura de los resultados

La hemadsorción consiste en la unión de muchos eritrocitos porcinos a la superficie de las células infectadas. En ausencia de hemadsorción, un ECP basado en la reducción del número de células adherentes puede deberse a citotoxicidad del inóculo, al virus de la enfermedad de Aujeszky o a VPPA no hemadsorbente, lo cual puede detectarse mediante FAT en el sedimento celular o mediante la PCR (véase más adelante). Si no se observa cambio, o si los resultados de la inmunofluorescencia o de PCR son negativos, el sobrenadante se subcultiva hasta 3 veces en cultivos nuevos de leucocitos. Todas las cepas deben confirmarse por PCR y secuenciación.

### 1.1.3. Aislamiento del virus en células de médula ósea porcinas

En los casos en los que no se puede contar con un suministro fiable o constante de sangre de cerdo desfibrinada para la prueba HAD, pueden utilizarse cultivos de células de médula ósea primarios como sistema de cultivo alternativo para el aislamiento del VPPA. Las células infectadas se detectan mediante FAT indirecta. La ventaja de este método de detección es que no está afectado por el fenotipo HAD. Este método también puede emplearse utilizando cultivos primarios de leucocitos o de macrófagos alveolares porcinos aplicando los procedimientos descritos arriba y sustituyendo la detección mediante la prueba HAD por la detección con eritrocitos de cerdo mediante la prueba FAT.

#### 1.1.3.1 Procedimiento analítico en cultivos primarios de células de médula ósea

- i) Se siembra un frasco de cultivo tisular de 25 cm<sup>2</sup> con  $5 \times 10^7$  células/ml empleando un medio de cultivo que contenga un 12,5% de suero fetal bovino (FCS) y antibióticos, y se incuba a 37°C durante 3 días.
- ii) Los medios se retiran con cuidado. Dado que la monocapa puede resultar fácilmente perturbada, puede ser necesario centrifugar los medios (1000 **g**, 3 minutos) para recuperar células desprendidas si se ha producido una perturbación importante de la monocapa. Se inocula el frasco con 1 ml de muestra problema y se incuba 1 hora a 37°C.
- iii) Se retira el inóculo y se lava con cuidado la monocapa con PBS. Se lleva a cabo un paso más de centrifugación del inóculo y el PBS si durante este paso se han retirado cantidades importantes de células.

- iv) Se añade medio nuevo al frasco y se incuba durante 5–7 días a 37°C en una incubadora humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>.
- v) Se recoge el sobrenadante del cultivo celular transfiriéndolo a un tubo de centrifuga, se centrifuga para eliminar los detritos celulares y se congela a –70°C para conservarlo o para un posterior subcultivo.
- vi) Se puede llevar a cabo una tinción de antígenos del VPPA con anticuerpos fluorescentes en las células infectadas procedentes del frasco que hayan sido secadas sobre un portaobjetos de microscopio cargado positivamente. Primero, se raspan las células de la superficie del frasco empleando un raspador de células estéril. Se transfiere una alícuota a un tubo de centrifuga y después se hacen precipitar las células con una centrifugación a 1000 **g** durante 3 minutos.
- vii) Se vuelve a suspender el precipitado celular en 1 ml de medio de cultivo celular o PBS y se depositan 300 µl en un porta, se secan al aire y se fijan con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- viii) Se lavan los portas sumergiéndolos 3–4 veces en PBS nuevo, a continuación se tiñen con inmunoglobulina anti VPPA conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a la dilución recomendada o pre-titulada, durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda.
- ix) Los portas control positivo y negativo se fijan y tiñen del mismo modo.
- x) Se lavan los portas sumergiéndolos 3-4 veces en PBS nuevo, se montan las células teñidas en PBS/glicerol, y se examinan en un microscopio óptico vertical de luz ultravioleta con barrera adecuada y filtros de excitación.
- xi) *Lectura de los resultados*

Las muestras problema son positivas si se observa fluorescencia citoplasmática específica en células de médula ósea porcinas inoculadas.

## 1.2. Detección de antígeno mediante la prueba de la inmunofluorescencia

Se puede utilizar FAT como un método adicional para detectar antígeno en tejidos de cerdos sospechosos en el campo o inoculados en el laboratorio. La FAT positiva, junto con signos clínicos y lesiones compatibles, puede proporcionar un diagnóstico provisional de la PPA. También puede emplearse para detectar el antígeno del VPPA en cultivos de leucocitos donde no se ha observado HAD y poder así identificar cepas no hemadsorbentes de virus. También distingue entre el ECP producido por VPPA y por otros virus, como el virus de la enfermedad de Aujeszky o por un inóculo citotóxico. Sin embargo, es importante observar que, en enfermedades subagudas y crónicas, la FAT tiene una sensibilidad muy reducida. Esta reducción en la sensibilidad puede estar relacionada con la formación de complejos antígeno-anticuerpo en los tejidos de los cerdos infectados que bloquean la interacción entre el antígeno del VPPA y el conjugado de anticuerpo detector (Sánchez-Vizcaíno & Arias, 2012).

### 1.2.1. Procedimiento analítico

- i) Se preparan cortes congelados o frotis por impronta de tejidos problema, o se extiende el sedimento celular de los cultivos de leucocitos inactivados en portas, se secan al aire y se fijan con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- ii) Se tiñen con inmunoglobulina anti-VPPA conjugada con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) a la dilución recomendada o pre-titulada, durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda.
- iii) Se fijan y tiñen preparaciones control positivas y negativas de forma similar.
- iv) Se lavan por inmersión cuatro veces en PBS fresco y aséptico, se montan los tejidos teñidos en PBS/glicerol, y se examinan al microscopio de luz ultravioleta con protección adecuada y filtros de excitación.
- v) *Lectura de los resultados*

Los tejidos son positivos si se observa una fluorescencia granular específica y citoplásmica en el tejido paracortical de órganos linfoides o en los macrófagos fijados en otros órganos, o en cultivos de leucocitos inoculados.

### 1.3. Detección del genoma vírico por la reacción en cadena de la polimerasa

Se han desarrollado técnicas de PCR utilizando cebadores de una región muy conservada del genoma para detectar e identificar una amplia gama de cepas pertenecientes a todos los genotipos víricos conocidos, incluyendo virus no hemadsorbentes y cepas de baja virulencia. Se ha comprobado que las técnicas de la PCR que se utilizan son particularmente útiles para identificar ADN vírico en tejidos de cerdos que son inadecuados para el aislamiento de virus o la detección de antígeno debido a que han sufrido putrefacción o cuando hay buenas razones para sospechar que el virus puede haberse inactivado antes de que las muestras hayan llegado al laboratorio. Debido a la alta sensibilidad y alta especificidad, junto con la posibilidad de una aplicación de alto rendimiento, la PCR es un método recomendado para el cribado y la confirmación de los casos sospechosos.

Se han descrito varios métodos de PCR en tiempo real convencional (Agüero *et al.*, 2003; Basto *et al.*, 2006; Fernández-Pinero *et al.*, 2013; King *et al.*, 2003; Tignon *et al.*, 2011) y existen varios kits comerciales de PCR para la detección del VPPA. También se han descrito técnicas de RT-PCR dúplex para la detección simultánea y diferencial del VPPA y del VPPC (Agüero *et al.*, 2004; Haines *et al.*, 2013). Todo protocolo de PCR que se utilice debe haber sido validado para el uso en cuestión, según lo establecido en el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas* y el Capítulo 2.2.3 *Desarrollo y optimización de pruebas de detección de ácido nucleico* para más detalles sobre las técnicas de PCR.

Se describen tres métodos validados de PCR (Agüero *et al.*, 2003; Fernández-Pinero *et al.*, 2013; King *et al.*, 2003) que consisten en un procedimiento de preparación de la muestra seguido del procedimiento analítico. Estos procedimientos sirven de modelo general y como punto de partida para protocolos de PCR. Las condiciones óptimas de reacción (tiempos de incubación y temperatura, modelos y suministradores de equipos, concentraciones de los reactivos para la prueba, como cebadores y dNTPs) pueden variar, de modo que primero deben comprobarse las condiciones descritas.

#### 1.3.1. Procedimiento de preparación de la muestra

Existen kits de extracción de ADN para la preparación del molde apropiado para la PCR dependiendo de la muestra que se vaya a analizar, y pueden ser adecuados para su uso. En las publicaciones citadas, se ofrecen los correspondientes detalles (Agüero *et al.*, 2003; Fernández-Pinero *et al.*, 2013; King *et al.*, 2003), así como en los métodos actuales de los Laboratorios de Referencia (véase la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre*). La detección del VPPA se puede llevar a cabo paralelamente a la del VPPC (véase el Capítulo 3.8.3 *Peste porcina clásica* para conocer los métodos moleculares de detección del VPPC).

Se pueden procesar diferentes muestras para el análisis por PCR, tales como sobrenadantes de cultivo celular, sangre con EDTA, suero y tejidos homogeneizados. Los hisopos de sangre pueden ser útiles como muestras de jabalíes salvajes.

Para los órganos y las muestras de tejidos, se debe preparar primero un homogenado del material al 1/10 en PBS estéril 1x y centrifugar después a 12.000 **g** durante 5 minutos. Se extraen los ácidos nucleicos del líquido sobrenadante resultante. Algunas veces es recomendable procesar una dilución de sobrenadante al 1/10 en paralelo (por ejemplo, si el homogenado de órganos tiene un aspecto turbio y/o se sospecha de exceso de contenido en ADN genómico).

Muestras control para el paso de la extracción de ADN: en cada ciclo de extracción de ácido nucleico debe incluirse al menos un control positivo y uno negativo. Las muestras de control positivo deben ser suero, sangre en EDTA u homogenados de tejido al 1/10 (el mismo tipo de tejido que el de las muestras problema) positivos al VPPA. Es muy recomendable que el control positivo se prepare de tal forma que tenga un límite de detección cercano al de la técnica para monitorear el rendimiento del procedimiento de extracción de ADN (por ejemplo, que dé un ciclo umbral [Ct] de 32±2 en la PCR en tiempo real). El control negativo puede consistir en agua o sangre, suero o homogenado de tejido en EDTA negativos para VPPA. Se procesan los controles paralelamente a las muestras problema. La calidad de la preparación del ácido nucleico puede afectar a la efectividad de la amplificación mediante PCR.

Para la extracción del ADN, deben seguirse las instrucciones del fabricante. Por último, se lleva a cabo la elución del ácido nucleico, preferiblemente empleando agua de grado molecular (que permitirá recuperar tanto ADN como ARN, por si se requiere comprobar tanto la presencia del VPPA y del VPPC). El ADN eluido debe utilizarse de inmediato o conservarse a -20 °C hasta su uso.

### 1.3.2. Amplificación por PCR mediante PCR convencional (Agüero *et al.*, 2003)

El conjunto de cebadores del VPPA descrito en este procedimiento puede combinarse con un conjunto de cebadores específico para el VPPC en un método de RT-PCR múltiple que permite la detección simultánea y diferenciada de ambos genomas del virus en una única reacción (Agüero *et al.*, 2004).

Muestras control para el paso de amplificación del ADN: en cada ejecución de la PCR, debe incluirse al menos un control positivo y un control negativo. El control positivo debe consistir en 2 µl de ADN positivo para el VPPA. Es muy recomendable que el control positivo se sitúe cerca del límite de detección de la PCR con el fin de comprobar el rendimiento del procedimiento de amplificación del ADN (por ejemplo, de tal forma que dé un valor Ct de 32±2 en la PCR en tiempo real). El control negativo debe consistir en 2 µl de agua estéril sin nucleasa o ADN extraído de sangre, suero o homogenado de tejido en EDTA negativos para el VPPA.

#### 1.3.2.1. Soluciones reserva

- i) Agua estéril sin nucleasa.
- ii) Puede comprarse ADN polimerasa de arranque en caliente, Tampón II para PCR, y cloruro de magnesio.
- iii) Puede comprarse también la mezcla de nucleótidos para PCR, que contiene cada una de las dNTP a una concentración de 10 mM.
- iv) Cebadores a una concentración 20 pmoles/µl: Secuencia del Cebador 1, 5'-AGT-TAT-GGG-AAA-CCC-GAC-CC-3' (cebador directo); Secuencia del Cebador 2, 5'- CCC-TGA-ATC-GGA-GCA-TCC-T-3' (cebador inverso).
- v) Tampón de carga 10x xileno cianol al 0,2%, azul de bromofenol al 0,2%, glicerol al 30%.
- vi) Tampón TAE (50x) para el gel de agarosa: Tris base (242 g); ácido acético glacial (57,1 ml); EDTA 0,5 M, pH 8,0 (100 ml); agua destilada (hasta 1 litro).
- vii) Solución de agarosa al 2%: existe a la venta agarosa adecuada para preparar una solución al 2% en tampón TAE 1x.
- viii) ADN marcador de peso molecular: existe a la venta una escala de 100 pares de bases.
- ix) Existe a la venta tinción de intercalado de ADN bicatenario

#### 1.3.2.2. Protocolo de la PCR convencional

- i) Se prepara para cada muestra la mezcla primaria de reacción para PCR en un tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 ml para el número de muestras a analizar y se cuenta como mínimo una muestra adicional.
- ii) Se prepara la mezcla para reacción PCR hasta un volumen final de 25 µl por muestra, añadiendo los siguientes reactivos a las concentraciones finales indicadas: tampón de PCR 1x, cloruro de magnesio 2 mM (puede incluirse en el tampón de PCR), mezcla de las dNTP, cada una a una concentración final de 0,2 mM, cebador PPA-1, 20 pmol/µl (0,25 µl, concentración final de 0,2 µM), cebador PPA-2, 20 pmol/µl (0,25 µl, a una concentración final de 0,2 µM), 0,625 U de ADN polimerasa hot-start y agua destilada sin nucleasa o estéril.
- iii) Se añaden 23 µl de mezcla de reacción de PCR al número necesario de tubos de PCR de 0,2 ml.
- iv) Se añaden 2 µl del molde de ADN extraído a cada tubo de PCR. Se incluye un control de reacción positivo (2 µl del ADN del VPPA) y un control de reacción negativo (2 µl de agua destilada) para cada ejecución de la PCR.
- v) Se colocan todos los tubos en un termociclador automático y se desarrolla el siguiente programa:  
Un ciclo a 95°C durante 10 minutos.  
40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos.  
Un ciclo a 72°C durante 7 minutos.  
Se mantiene a 4°C.

**Nota:** El programa de termociclado puede variar según la ADN polimerasa que se utilice, pero las condiciones indicadas arriba sirven como referencia y es el programa establecido en el procedimiento original (Agüero *et al.*, 2003).

- vi) Al finalizar el programa, se retiran los tubos de PCR y se añaden 2,5 µl de tampón de carga 10x a cada tubo.
- vii) Se ponen todas las muestras en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1x que contenga tinción de intercalado de ADN (la concentración idónea dependerá de cada colorante, deben seguirse las instrucciones del fabricante).
- viii) Se añade el ADN marcador a un pocillo en cada gel.
- ix) Se ejecuta el gel a un voltaje constante de 150–200 voltios durante unos 30 minutos.
- x) Se examina el gel con luz UV o azul. En una muestra positiva, se presentará una banda definida que debe co-migrar con el producto de la PCR del control positivo. Se calcula el tamaño de los productos de la PCR en las muestras problema y en el control positivo respecto al marcador de ADN estándar. El producto de la PCR del control positivo tiene un tamaño de 257 pares de bases. No deben verse bandas en el control negativo.

### 1.3.3. Procedimiento 1 de PCR en tiempo real (King *et al.*, 2003)

#### 1.3.3.1. Soluciones reserva

- i) Agua estéril libre de nucleasa u otra agua estéril apropiada y mezcla primaria de reacción para PCR (2x).
- ii) Se preparan los cebadores a una concentración de 50 pmoles/µl: Secuencia del Cebador 1, 5'-CTGCT-CATGG-TATCA-ATCTT-ATCGA-3' (cadena positiva); Secuencia del Cebador 2, 5'-GATAC-CACAA-GATC(AG)-GCCGT-3' (cadena negativa).
- iii) Se incluye una sonda de hidrólisis marcada con fluorescencia a una concentración de 5 pmoles/µl: (5'-[6-carboxi-fluoresceína (FAM)]- CCACG-GGAGG-AATAC-CAACC-CAGTG-3'-[6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA)]).

#### 1.3.3.2. Amplificación por PCR

- i) Se prepara para cada muestra la mezcla de reacción de PCR que se describe abajo, en un tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 ml. Se prepara la mezcla primaria para el número de muestras a analizar y contando una muestra adicional.

Agua estéril o libre de nucleasa (7,5 µl); mezcla base de reacción para PCR 2x (12,5 µl); cebador 1, 50 pmoles (1,0 µl); cebador 2, 50 pmoles (1,0 µl); sonda marcada con fluorescencia, 5 pmoles (1 µl).

- ii) Se añaden 22 µl de mezcla de reacción de PCR a un pocillo de una placa de reacción óptica por cada muestra a analizar.
- iii) Se añaden 3 µl del molde extraído de ADN o de un control de extracción en blanco, y se cubre bien con una tapa.
- iv) Se centrifuga la placa durante 1 minuto en una centrífuga adecuada para mezclar el contenido de cada pocillo.
- v) Se coloca la placa en un sistema de detección de secuencias para amplificación por PCR (máquina de PCR en tiempo real equipada con canal de fluorescencia FAM) y se desarrolla el siguiente programa:

Un ciclo a 50°C durante 2 minutos.

Un ciclo a 95°C durante 10 minutos.

Cuarenta ciclos a 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 1 minuto.

Nota: Si no se dispone de termociclador específico para este fin, se puede utilizar un termociclador ordinario y analizar los productos de PCR por lectores de fluorescencia a punto final o, alternativamente, por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. Se espera un producto de 250 pb.

- vi) *Lectura de los resultados*

Se asigna un valor de ciclo umbral ( $C_T$ ) a cada reacción de PCR a partir de un análisis de todas las representaciones gráficas de amplificación (una gráfica de la señal de fluorescencia frente al número de ciclos). Las muestras problema negativas, los controles negativos no infectados o los controles de extracción en blanco deben tener un valor  $C_T$

>40,0. Las muestras problema positivas y los controles positivos deben tener un valor  $C_T < 40,0$  (las muestras fuertemente positivas tienen un valor  $C_T < 30,0$ ).

Las modificaciones de este protocolo empleando distintos kits comerciales de amplificación pueden aportar rendimientos de la PCR incluso mayores, pero estos kits de amplificación deben estar totalmente validados antes de ser utilizados. Fernández-Pinero *et al.*, 2010 validaron una modificación de esto empleando un protocolo de amplificación rápida para fines de diagnóstico (se puede consultar el protocolo detallado en Fernández-Pinero *et al.*, 2013).

#### 1.3.4. Procedimiento 2 de PCR en tiempo real (Fernández-Pinero *et al.*, 2013)

Se ha comprobado que este método de PCR en tiempo real presenta la máxima sensibilidad en la detección de ADN del VPPA en fases muy tempranas de la infección y en animales infectados de forma crónica, en los cuales el nivel de viremia suele ser bastante bajo (Fernández-Pinero *et al.*, 2013; Gallardo *et al.*, 2015a).

##### 1.3.4.1. Soluciones reserva

- i) Agua estéril sin nucleasa.
- ii) Existen varios kits comerciales de PCR en tiempo real (los kits que se escojan deben estar validados para su uso con fines de diagnóstico).
- iii) Los cebadores se preparan a una concentración de 20 pmol/ $\mu$ l: cebador ASF-VP72-F secuencia 5'-CCC-AGG-RGA-TAA-AAT-GAC-TG-3' (cebador directo); cebador ASF-VP72-R secuencia 5'-CAC-TRG-TTC-CCT-CCA-CCG-ATA-3' (cebador inverso).

**Note:** el código de nucleótidos, R = A+G posición de bases mixta.

- iv) Existe a la venta y lista para usar una sonda de hidrólisis marcada (10 pmol/ $\mu$ l, marcada con tinción indicadora FAM) (véase Fernández-Pinero *et al.*, 2013 para más información).

**Nota:** si no es posible disponer de la sonda específica, puede sustituirse por la siguiente sonda estándar empleando una concentración y unas condiciones de reacción idénticas: (5'-[6-carboxy-fluorescein (FAM)]-TCC-TGG-CCR-ACC-AAG-TGC-TT-3'-[silenciador de agujero negro (BHQ)])

##### 1.3.4.2. Amplificación por PCR

Muestras control para el paso de amplificación del ADN: en cada ejecución de la PCR debe incluirse al menos un control positivo y un control negativo. La muestra de control positivo debe ser ADN positivo para el VPPA. Es muy recomendable que el control positivo esté cercano al límite de detección de la PCR para comprobar el rendimiento del procedimiento de amplificación del ADN (por ejemplo, que dé un valor de  $C_t$  de  $32 \pm 2$  en la PCR en tiempo real). El control negativo debe ser 2  $\mu$ l de agua estéril sin nucleasa.

- i) En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, se prepara la mezcla para reacción PCR describa abajo para cada muestra. Se prepara la mezcla para reacción a granel para el número de muestras que se analizarán, y como mínimo una adicional.
- ii) La mezcla de reacción de PCR consiste en: agua destilada sin nucleasa o estéril (7  $\mu$ l), mezcla primaria 2x (10  $\mu$ l), cebador ASF-VP72-F, 20 pmol/ $\mu$ l (0,4  $\mu$ l), cebador ASF-VP72-R, 20 pmol/ $\mu$ l (0,4  $\mu$ l), sonda de hidrólisis marcada con fluorescencia, 10 pmol/ $\mu$ l (0,2  $\mu$ l).
- iii) Se añaden 18  $\mu$ l de la mezcla de reacción de PCR al número necesario de tubos ópticos de PCR de 0,2 ml.
- iv) Se añaden 2  $\mu$ l del molde de ADN extraído a cada tubo de PCR. Se incluye un control positivo (2  $\mu$ l de ADN de VPPA) y un control negativo (2  $\mu$ l de agua destilada) en cada ejecución de la PCR.
- v) Se colocan todos los tubos en un termociclador de PCR en tiempo real (equipado con canal de fluorescencia FAM) y se ejecuta el siguiente programa:

Un ciclo a 95°C durante 5 minutos.

45 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos. Se programa la obtención de fluorescencia en el canal FAM al final de cada ciclo.

**Nota:** El programa de incubación puede variar según la ADN polimerasa que se utilice, pero el indicado sirve como norma general y es el establecido en la publicación del procedimiento original (Fernández-Pinero *et al.*, 2013).

vi) Lectura de los resultados

El punto en el que la medición de la fluorescencia es superior a la señal de fondo y alcanza el nivel detectable se denomina ciclo umbral (Ct), y viene determinado automáticamente por el software del equipo de PCR. Será el nivel de fluorescencia a partir del cual una muestra se considerará positiva.

En una muestra positiva, se obtendrá una curva de amplificación en forma sigmoidea siempre que el Ct sea <40. Las muestras que den un Ct  $\geq 38$  deberán considerarse ambiguas si se observa un gráfico sigmoideo, y en estos casos deberá repetirse el análisis para confirmar el resultado. Las muestras negativas mantendrán el perfil de fluorescencia por debajo del nivel de fluorescencia de fondo y el equipo no indicará valor Ct.

Las muestras que den un valor Ct >40 pueden considerarse negativas a no ser que los resultados de las técnicas de serología o la información epidemiológica indiquen la posibilidad de una infección por el VPPA. En este caso, el análisis deberá repetirse para confirmar el resultado negativo de la PCR.

#### 1.4. Enzimoimmunoanálisis de detección de antígeno

Como método alternativo, puede llevarse a cabo un ELISA de detección de antígeno, pero su sensibilidad es muy inferior a la de la PCR o la HAD, no debe utilizarse como método único para la detección del virus y los resultados deben confirmarse con una PCR o una HAD. Existe un kit comercial para su uso con muestras de sangre, bazo o ganglios linfáticos porcinos, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Este kit consiste en un ELISA tipo sándwich de doble anticuerpo. La placa está recubierta por un MAb específico de la proteína de la cápsida del virus que se une al VPPA en las muestras positivas. Tras el lavado, se añade un segundo MAb específico de un epítipo distinto de la proteína de la cápsida y conjugado a peroxidasa. La unión de este segundo anticuerpo al antígeno capturado se detecta al añadir el sustrato apropiado.

## 2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas son las pruebas de diagnóstico más utilizadas debido a su simplicidad, su coste relativamente bajo y el hecho de que requieren equipo e instalaciones poco especializados. En el caso del diagnóstico de la PPA, esto es especialmente relevante porque no existe ninguna vacuna comercial contra el VPPA, lo cual significa que la presencia de anticuerpos anti-VPPA siempre indica infección. Además, los anticuerpos anti-VPPA aparecen poco después de la infección (7–10 días) y persisten durante varios meses o incluso años. Los cerdos domésticos y los jabalíes infectados por cepas virulentas normalmente mueren antes de que aparezca respuesta inmunitaria humoral específica. En las zonas con una infección por el VPPA bien establecida, donde también circulan cepas del virus atenuadas y poco virulentas, la detección serológica es crucial para la identificación de animales recuperados y con infecciones asintomáticas. No existen anticuerpos totalmente neutralizantes.

La más utilizada es el ELISA (Gallardo *et al.*, 2015b; Sánchez-Vizcaíno, 1987), que es adecuado para examinar suero o plasma. Las muestras que den positivo en el ELISA deben confirmarse mediante otras pruebas, como la IFAT o la inmunotransferencia (Gallardo *et al.*, 2015b; Pastor *et al.*, 1989). Normalmente no se detectan anticuerpos en cerdos infectados con VPPA virulentos, ya que mueren antes de que eso se produzca. En cerdos infectados con virus de la PPA de baja o moderada virulencia se producen anticuerpos. Se ha validado una prueba para realizar en la propia explotación (prueba de flujo lateral) destinada a la detección de anticuerpos, y se está comercializando.

Recientemente, se han llevado a cabo estudios extensos para evaluar la especificidad y la sensibilidad de las pruebas serológicas de detección de la PPA en distintos escenarios epidemiológicos de África y de Europa. Estos estudios han incluido las cepas del genotipo II del VPPA actualmente circulantes en Europa del este y en África oriental que presentan más variabilidad. Los resultados han mostrado que las pruebas recomendadas por la OIE para certificar a los animales antes de los desplazamientos (véase la Tabla 1) permiten detectar la presencia de anticuerpos contra el VPPA en todas las situaciones epidemiológicas evaluadas, con exactitud y con una sensibilidad adecuada (Gallardo *et al.*, 2013; 2015b).

Cuando la PPA es endémica, la confirmación de casos sospechosos de enfermedad puede realizarse mediante una prueba serológica estándar (ELISA), combinada con una prueba serológica alternativa (IFAT, IPT, IBT) o una prueba de detección del antígeno. En algunos países, más del 95% de los casos positivos se han identificado mediante una combinación de pruebas IFA y FAT.

Debe destacarse que cuando los cerdos se infectan por cepas avirulentas o de baja virulencia, las pruebas serológicas pueden ser el único modo de detectar a los animales infectados.

## 2.1. Enzoinmunoanálisis

El ELISA es una prueba directa que permite detectar anticuerpos contra el VPPA en cerdos que han sido infectados por virus con una virulencia baja o moderada. Actualmente, se dispone de varios kits comerciales de ELISA basados en un formato de competición o indirecto para la detección de anticuerpos contra el VPPA y validados para su uso en distintas situaciones epidemiológicas. Una alternativa más barata consiste en preparar un antígeno soluble para utilizarlo en un ELISA indirecto, y más adelante se describe el procedimiento para usar este antígeno soluble.

Se recomienda llevar a cabo una segunda prueba confirmativa, como la IBT, la IFAT o la IPT, descritas más adelante, en casos de resultado dudoso o de un resultado positivo cuando se sospecha que los sueros se han conservado de forma deficiente.

### 2.1.1. Preparación del antígeno para el ELISA

El antígeno para ELISA se prepara a partir de células infectadas cultivadas en presencia de suero porcino (Escribano *et al.*, 1989).

- i) Se infectan células MS (células estables de mono) a una multiplicidad de infección de 10 con virus adaptado, y se incuban en un medio que contenga un 2% de suero porcino.
- ii) Se recogen las células a las 36–48 horas de la infección, cuando el ECP es extenso. Se lavan con PBS, se precipitan a 650 **g** durante 5 minutos, se lava el sedimento celular con sacarosa 0,34 M en Tris/HCl 5 mM, pH 8,0, y se centrifuga para sedimentar las células.

Se realizan los pasos (iii) a (v) en hielo:

- iii) Se resuspende el sedimento celular con sacarosa 67 mM en Tris/HCl 5 mM, pH 8,0 (1,8 ml por recipiente de 175 cm<sup>2</sup>) y después de 5 minutos se deja con agitación durante 10 minutos.
- iv) Se añade el detergente no iónico Nonidet-P40 a una concentración final de 1% (p/v) y se deja 10 minutos (con agitación cuando hayan pasado 5 minutos) para lisar las células.
- v) Se añade sacarosa a una concentración final del 64% (p/p) en Tris/HCl 0,4 M, pH 8,0, y se centrifuga a 1.000 **g** durante 10 minutos para sedimentar los núcleos.
- vi) Se recoge el sobrenadante y se añade EDTA (concentración final 2 mM), beta-mercaptoetanol (concentración final 50 mM) y NaCl (concentración final 0,5 M) en Tris/HCl 0,25 mM, pH 8,0, y se incuba durante 15 minutos a 25°C.
- viii) Se centrifuga a 100.000 **g** durante 1 hora a 4°C sobre una capa de sacarosa al 20% (p/p) en Tris/HCl 50 mM, pH 8,0.

Se extrae la banda situada inmediatamente por encima de la capa de sacarosa y se utiliza como antígeno en el ELISA. Se guarda a –20°C.

### 2.1.2. Procedimiento del ELISA indirecto (Pastor *et al.*, 1990)

- i) Se antigenan la(s) microplaca(s) de 96 pocillos para ELISA añadiendo a cada pocillo 100 µl de la dilución recomendada o pre-titulada del antígeno en tampón carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6.
- ii) Se incuban a 4°C durante 16 horas (toda la noche) y a continuación se lavan cinco veces con Tween 20 al 0,05% en PBS, pH 7,2.
- iii) Se diluye el suero problema y los sueros control positivo y negativo a 1/30 con Tween 20 al 0,05% en PBS, pH 7,2, y se añaden 100 µl de cada dilución de suero por duplicado a pocillos de la(s) placa(s) antigenizada(s).
- iv) Se incuban las placas a 37°C durante 1 hora (de modo opcional, en un agitador de placas) y se lavan después cinco veces con Tween 20 al 0,05% en PBS.
- v) Se añaden a cada pocillo 100 µl del conjugado proteína-A/peroxidasa de rábano (Pierce) a la dilución recomendada o pre-titulada en Tween 20 al 0,05% en PBS.
- vi) Se incuban las placas a 37°C durante 1 hora y se lavan después cinco veces con Tween 20 al 0,05% en PBS.
- vii) Sustrato: Se añaden 200 µl de sustrato DMAB/MBTH a cada pocillo preparado del siguiente modo:

El volumen necesario por placa es de 10 ml de solución DMAB 80,6 mM + 10 ml de solución MBTH 1,56 mM + 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

a) Preparación del sustrato DMAB/MBTH

DMAB – Ácido 3-Dimetilaminobenzoico (SIGMAD-0787); MBTH – 3-Metil-2-benzotiazolinona hidrazona hidrocloreto monohidrato (IGMA M-8006).

b) Solución DAMB 80,6 mM

Se disuelven 13,315 g de ácido DAMB en 1.000 ml tampón fosfato 0,1 M, pH 7 (5,3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,65 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> hasta completar 1000 ml en agua destilada) mediante agitación continua durante 1 hora a temperatura ambiente, ajustando el pH a 7 con NaOH (5 M). Se filtra a través de un embudo.

c) Solución MBTH 1,56 mM

Se disuelve 0,3646 g de MBTH en 1.000 ml tampón fosfato 0,1 M, pH 7 (5,3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,65 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> hasta completar 1000 ml en agua destilada) mediante agitación constante durante 1 hora, ajustando el pH a 6,25 con ácido clorhídrico concentrado. Se filtra a través de un embudo.

El sustrato se puede preparar en forma de soluciones reserva, distribuidas en alícuotas y mantenidas a -20°C. Se mezclan las soluciones DMAB y MBTH (1:1) inmediatamente antes de usar y se añade la cantidad requerida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

Como alternativa, se puede utilizar ortofenilendiamina (OPD) al 0,04% en lugar de DMAB/MBTH. Se prepara en tampón fosfato/citrato, pH 5,0, a razón de 10 µl/25 ml. Se añaden 100 µl de sustrato a cada pocillo. **Nota:** cuando se utiliza el sustrato OPD, el número de falsos positivos aumenta.

- viii) Se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 6-10 minutos (antes de que el control negativo empiece a presentar color). El tiempo necesario para la aparición del color dependerá de la temperatura del sustrato en el momento de añadirlo a los pocillos y de la temperatura ambiente.
- ix) Se detiene la reacción añadiendo a cada pocillo 100 µl de ácido sulfúrico 3 N.
- x) Lectura de los resultados: Los sueros positivos tienen color pálido, (amarillo en el caso del sustrato OPD, azul en el caso del sustrato DMAB/MBTH), visible a simple vista, pero para asegurarse de identificar todos los sueros positivos, es necesario leer por espectrofotometría la absorbancia de cada pocillo a 600-620 nm (en el caso del sustrato DMAB/MBTH) o a 492 nm (en el caso del sustrato OPD) en un lector de ELISA. Utilizando el sustrato DMAB/MBTH, la prueba se valida cuando el valor medio de absorbancia del control positivo es más de cuatro veces el valor medio de absorbancia del control negativo. Utilizando el sustrato OPD, se considerará positivo todo suero que tenga un valor de absorbancia superior a dos veces el valor de absorbancia medio del suero control negativo en la misma placa.

Para interpretar correctamente los resultados, es necesario calcular el PUNTO DE CORTE que permite diferenciar entre resultados negativos, dudosos y positivos. El punto de corte se establece mediante la siguiente ecuación:

$$\text{PUNTO DE CORTE} = \text{suero negativo de Densidad Óptica} \times 1 + \text{suero positivo de Densidad Óptica} \times 0,2.$$

- a) Los sueros con una densidad óptica inferior al PUNTO DE CORTE - 0,1 pueden considerarse negativos.
- b) Los sueros con una densidad óptica superior al PUNTO DE CORTE + 0,1 pueden considerarse positivos.
- c) Los sueros con una densidad óptica entre el PUNTO DE CORTE  $\pm$  0,1 pueden considerarse dudosos y el resultado tendrá que confirmarse mediante IPT, IFAT o IBT.

Este ELISA indirecto se ha mejorado y validado y tiene una mayor sensibilidad que la obtenida con el procedimiento previo cuando se utilizan muestras de suero obtenidas en fases tempranas de la infección, lo cual se ha conseguido ajustando el tiempo de incubación, las temperaturas de incubación, los tampones, las concentraciones del antígeno y las muestras, así como el tipo y concentración del

conjugado y el sustrato (Fernández-Pacheco *et al.*, 2016). De forma resumida, los sueros problema y control se diluyen a 1/10 en tampón de bloqueo (PBS que contenga un 0,05% de Tween 20, un 2% de leche desnatada y un 2% de suero porcino normal), y se deja como blanco un pocillo de la placa de ELISA que actúa como pocillo control (100 µl de tampón de bloqueo). Los sueros se incuban 2 horas a 37±2°C en un agitador de placas. Se mantiene el conjugado pre-titulado a una dilución de trabajo (intervalo sugerido de 1:5000–1:20000 de proteína A, 1 mg/ml) durante 45 minutos a 37±2°C en el agitador de placas. Por último, se utiliza un sustrato nuevo, añadiendo 100 µl/pocillo de solución sustrato (ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-ácido sulfónico)] e incubando 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se detiene añadiendo 100 µl/pocillo de solución de parada (dodecilsulfato de sodio al 1%) y los resultados se obtienen a una longitud de onda de 405 nm. Para la interpretación de los resultados, la prueba se valida cuando la media de la densidad óptica obtenida en el blanco (ODblank) es <0,250. El valor de corte (VCO) es la media de la OD NC (densidad óptica del control negativo) x 2. El valor de corte índice (ICO) definirá el resultado y se calcula como  $ICO = (Od \text{ media de la muestra})/VCO$ . Las muestras de suero con un ICO ≤1 se consideran negativas, con un ICO >1 ≤1,25, dudosas, y con un ICO >1,25, positivas.

## 2.2. Prueba de la inmunoperoxidasa indirecta (IPT)(Gallardo *et al.*, 2015b)

La IPT es una técnica de inmunocitoquímica en células fijadas útil para determinar la formación de complejos anticuerpo-antígeno a través de la acción de la enzima peroxidasa. En este procedimiento, se infectan células de riñón de mono verde Africano (Vero) o MS con cepas del VPPA adaptadas a estos cultivos celulares. Las células infectadas se fijan y se utilizan como antígenos para determinar la presencia de los anticuerpos específicos contra la PPA.

La IPT debe utilizarse como una prueba confirmativa para sueros procedentes de zonas libres de PPA que son positivos en el ELISA, y para sueros de zonas endémicas que dan resultados dudosos en el ELISA. Dada su superior sensibilidad y su rendimiento, es la mejor prueba para analizar muestras de sangre, líquidos o tejido exudado (Gallardo *et al.*, 2015b).

### 2.2.1. Preparación de placas de 96 pocillos recubiertas con VPPA fijados adaptados

- i) Se subcultivan células MS o Vero a una proporción de 1:2 y se distribuye la suspensión celular diluida en el número necesario de microplacas de 96 pocillos (área de crecimiento/pocillo 0,32 cm<sup>2</sup>).
- ii) Se incuban durante 24 horas (Vero) o 48 horas (MS) a 37±3°C en una incubadora humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub> para lograr una placa con un 80-90% de confluencia. Tras una incubación de 24 o 48 horas, el medio de los cultivos celulares de las placas de 96 pocillos se decanta con cuidado.
- iii) En otro frasco, se prepara la dilución apropiada (en medio de cultivo sin FCS) del VPPA adaptado para inocular con una m.d.i (multiplicidad de infección) de 0,025 a 0,05.

El factor de dilución se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de dilución} = \frac{0.7 \times \text{título vírico} \times \text{volumen}}{\text{Número de células} \times \text{m.d.i}}$$

- iv) Se inoculan las placas con 100 µl del inóculo/pocillo y se incuban a 37±3°C en una incubadora humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>:
  - a) 18±1 horas en el caso de las placas con células Vero infectadas.
  - b) 24±1 horas en el caso de las placas con células MS infectadas: en este caso, tras 2 horas a 37±3°C, se completa el volumen hasta 200 µl con medio +4% FCS (concentración final del 2% SFBi).
- v) Se fijan las células: los inóculos se eliminan mediante succión por vacío y las hojas de células infectadas por el VPPA se fijan con una solución fría que contenga metanol al 70% y acetona al 30% durante 8±2 minutos a temperatura ambiente. Por último, las placas se lavan con PBS 3-5 veces durante 5 minutos cada una, en el agitador de placas.
- vi) Las placas de IPT fijadas y secadas se puede utilizar directamente o bien conservarse a <-10°C.

### 2.2.2. Procedimiento de la IPT

- i) Se mantienen las placas de IPT para el VPPA a temperatura ambiente (18–25°C) durante 30 minutos tras la descongelación.
- ii) Paso de bloqueo: Se bloquean las placas añadiendo 100 µl/pocillo de solución de bloqueo (PBS/Tween 20 0,05%, pH 7,2 [±0,2]/leche al 5%). Se incuban 1 hora a 37±2°C sobre el agitador de placas.
- iii) Preincubación de la muestra: En otra placa de microtitulación de 96 pocillos, se diluyen a 1/40 las muestras (sueros, sangre, líquido o tejidos exudados) y los controles (positivo, límite y negativo) en solución de bloqueo (PBS/Tween 20 0,05%, pH 7,2 [±0,2]/leche al 5%) que contenga SFB al 2%. Se añaden 100 µl por pocillo y se incuban 1 hora a 37±2°C sobre el agitador de placas.
- iv) Incubación de la muestra: Tras 1 hora, se desecha la solución de bloqueo de las placas de IPT para el VPPA y se añaden 100 µl por pocillo de las muestras pre-incubadas y los controles. Se incuban durante 45 minutos a 37±2°C sobre el agitador de placas.
- v) Paso de lavado: Se lava tres veces con 100 µl/por pocillo de PBS 1x durante 5 minutos a 37±2°C sobre el agitador de placas.
- vi) Se añaden 100 µl de conjugado de proteína A con peroxidasa por pocillo diluido a 1/5000 en solución de bloqueo. Se incuban durante 45 minutos a 37±2°C sobre el agitador de placas.
- vii) Paso de lavado: Se lava tres veces con 100 µl/por pocillo de PBS 1x durante 5 minutos a 37±2°C sobre el agitador de placas.
- viii) Se añaden 50 µl/pocillo de solución sustrato y se incuban 5-10 minutos a temperatura ambiente (18–25°C).

*Solución sustrato:* La solución sustrato debe prepararse cuando vaya a utilizarse. Se mezclan 300 µl de solución reserva en 5 ml de tampón acetato + 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (este volumen se recomienda para una placa de 96 pocillos).

- a) Solución reserva (20 mg/comprimido de AEC (3-amino-9-etilcarbazol) en 2,5 ml de dimetilformamida (mantener a 4 ±3°C en la oscuridad).
- b) Tampón acetato: 74 ml de solución A + 176 ml de solución B. Conservar a temperatura ambiente. Caduca a los 6 meses.
  1. Solución A: ácido acético glacial 0,2 N (1,155 ml de ácido acético en 100 ml de agua). Conservar a temperatura ambiente.
  2. Solución B: acetato de sodio 0,2 M (2,72 g [±0,05] de AcNa tri-hidratado en 100 ml de agua). Conservar a temperatura ambiente.
- ix) Añadir PBS 1x a razón de 100 µl/por pocillo para detener la reacción.
- x) Lectura de los resultados: En los pocillos con muestras positivas para la PPA, se observará una coloración citoplasmática roja intensa en las células infectadas por el VPPA. La coloración citoplasmática roja se interpreta como resultado positivo para la PPA y su ausencia como resultado negativo.

En ciertas situaciones de muestras obtenidas de animales vacunados contra otras enfermedades, se puede observar un ligero fondo con una coloración roja inespecífica en los pocillos. En estos casos, las muestras deben analizarse respecto a células no infectadas en paralelo con células infectadas.

### 2.3. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

Esta prueba (Sánchez-Vizcaíno, 1987) debe utilizarse como prueba confirmativa para sueros de zonas consideradas libres de la PPA y que den un resultado positivo en el ELISA, y para sueros de zonas endémicas que den un resultado ambiguo en el ELISA.

#### 2.3.1. Procedimiento analítico

- i) Se prepara una suspensión de células de riñón porcino o de mono infectadas por el VPPA a una concentración de 5 × 10<sup>5</sup> células /ml, se esparcen gotas pequeñas en portas, se secan al aire y se fijan con acetona a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los portas se pueden guardar hasta su uso a –20°C.
- ii) Se inactivan los sueros problema por calor a 56°C durante 30 minutos.

- iii) Se añaden a los portas de células infectadas, y a los de células control no infectadas, diluciones apropiadas de los sueros problema y de los sueros control positivo y negativo en solución salina tamponada. Se incuban durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda.
- iv) Se lavan los portas por inmersión cuatro veces en PBS limpio y fresco y después con agua destilada.
- v) Se añaden a todos los portas diluciones recomendadas o predeterminadas de anticuerpos anti Ig de cerdo conjugados con ITCF o de proteína-A conjugada a ITCF. Se incuban durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda.
- vi) Se lavan los portas por inmersión cuatro veces en PBS limpio y fresco y después con agua destilada, se montan con PBS/glicerol, y se examinan en un microscopio de luz ultravioleta con filtros adecuados de barrera y de excitación.
- vii) *Lectura de los resultados:* El suero control positivo debe ser positivo sobre células infectadas y todos los otros controles deben ser negativos antes de la lectura de la prueba. Los sueros son positivos si los cultivos infectados muestran fluorescencia específica.

#### 2.4. Prueba de la inmunotransferencia (Pastor *et al.*, 1989)

Esta prueba debe utilizarse como alternativa a la IFA y la IPT para confirmar resultados dudosos con sueros determinados. Proporciona resultados adecuados en el caso de muestras débilmente positivas en la detección de anticuerpos contra la PPA a partir de la segunda semana post-infección. Se han determinado proteínas víricas que inducen anticuerpos específicos en cerdos. Estos polipéptidos se han colocado en tiras de antígeno y se ha demostrado que, en la prueba de inmunotransferencia, reaccionan con anticuerpos específicos a partir de los 9 días tras la infección.

##### 2.4.1. Preparación de tiras de antígeno

- i) Se preparan proteínas víricas citoplásmicas solubles como se describe para la preparación de antígeno para ELISA en el apartado B.2.1.
- ii) Se realiza una electroforesis en geles de acrilamida/N,N'-dialiltartardiamida (DATD) al 17% con estándares e peso molecular adecuado.
- iii) Se transfieren las proteínas a membranas de nitrocelulosa de 14 × 14 cm<sup>2</sup> mediante electroforesis a una corriente constante de 5 mA/cm en tampón de transferencia (metanol al 20% en glicina 196 mM, Tris/HCl 25 mM, pH 8,3).
- iv) Se secan las membranas y se marca el lado en el que se pasaron las proteínas por electroforesis.
- v) Se corta una tira desde el borde del filtro y se realiza inmunotransferencia por el procedimiento que se describe más adelante. Se identifica la región que contenga proteínas de 23–35 kDa comparando con los estándares de peso molecular sometidos paralelamente a la prueba, y se corta esta región en tiras de 0,5 cm de ancho. Se marca cada tira por el lado por el que se pasaron las proteínas por electroforesis.

Estas tiras, de aproximadamente 4 cm. de longitud, constituyen las tiras de antígeno utilizadas en inmunotransferencia y contienen proteínas con las que reaccionarán los anticuerpos de los sueros de cerdos enfermos y convalecientes. En algunos cerdos estos anticuerpos persisten durante toda la vida.

##### 2.4.2. Preparación de la solución del sustrato cloranaftol

Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de ser utilizada.

- i) Se disuelven 6 mg de 4-cloro-1-naftol en 2 ml de metanol y se añade lentamente esta solución a 10 ml de PBS mientras se agita.
- ii) Se elimina por filtración en papel de filtro Whatman No. 1 el precipitado blanco que se forma (opcional).
- iii) Se añaden 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

##### 2.4.3. Procedimiento analítico

Las tiras de antígeno deben mantenerse con la cara marcada hacia arriba durante el proceso de la inmunoreacción.

- i) Se incuban las tiras con antígeno en tampón de bloqueo (leche en polvo desnatada al 2% en PBS) a 37°C durante 30 minutos con agitación continua.
- ii) Se preparan diluciones a 1/40 de los sueros problema y de los sueros control positivos y negativos en tampón de bloqueo.
- iii) Se incuban las tiras con antígeno en el suero apropiado a 37°C durante 45 minutos con agitación continua. Se incuban una tira de antígeno con el suero control positivo y otra con el suero control negativo. Estas dos tiras son los controles. Se lavan cuatro veces con tampón de bloqueo; el lavado final debe durar 5 minutos con agitación continua.
- iv) Se añade a todas las tiras con antígeno el conjugado de proteína-A/peroxidasa de rábano a la dilución recomendada o pre-titulada (generalmente a una dilución de 1/1000) en tampón de bloqueo. Se incuban a 37°C durante 45 minutos con agitación continua. Se lavan cuatro veces con tampón de bloqueo; el lavado final debe durar 5 minutos con agitación continua.
- v) Se prepara la solución de sustrato, se añade a las tiras con antígeno y se incuban a temperatura ambiente durante 5–15 minutos con agitación continua.
- vi) Se detiene la reacción con agua destilada cuando las bandas de proteína sean lo bastante oscuras.
- vii) *Lectura de los resultados:* Los sueros positivos reaccionan con más de una proteína vírica en la tira con antígeno; deben tener un modelo proteico similar y con la misma intensidad que las tiras de antígeno teñidas con el suero control positivo.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Actualmente no hay ninguna vacuna comercial contra la PPA.

## BIBLIOGRAFÍA

ACHENBACH J.E., GALLARDO C., NIETO-PELEGRÍN E., RIVERA-ARROYO B., DEGEFA-NEGI T., ARIAS M., JENBERIE S., MULISA D.D., GIZAW D., GELAYE E., CHIBSSA T.R., BELAYE A., LOITSCH A., FORSA M., YAMI M., DIALLO A., SOLER A., LAMIEN C.E. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2017). Identification of a New Genotype of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.*, **64**, 1393–1404.

AGÜERO M., FERNÁNDEZ J., ROMERO L., SANCHEZ C., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2003). Highly sensitive PCR assay for the routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4431–4434.

AGÜERO M., FERNÁNDEZ J., ROMERO L., ZAMORA M.J., SANCHEZ C., BELÁK S., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2004). A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever. *Vet. Res.*, **35**, 1–13.

ALEJO A., MATAMOROS T., GUERRA M. & ANDRÉS G. (2018). A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. *J. Virol.*, **92**, pii: e01293-18. doi: 10.1128/JVI.01293-18.

ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2002b). African swine fever eradication: the Spanish model. *In: Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, Iowa State University Press, pp 133–139. ISBN 0813803837.

BASTO A.P., PORTUGAL R.S., NIX R.J., CARTAXEIRO C., BOINAS F., DIXON L.K., LEITAO A. & MARTINS C. (2006). Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. *Arch. Virol.*, **151**, 819–826.

BISHOP R.P., FLEISCHAUER C., DE VILLIERS E.P., OKOTH E.A., ARIAS M., GALLARDO C. & UPTON C. (2015). Comparative analysis of the complete genome sequences of Kenyan African swine fever virus isolates within p72 genotypes IX and X. *Virus Genes*, **50**, 303–309.

BOSHOF C.I., BASTOS A.D., GERBER L.J. & VOSLOO W. (2007). Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973–1999). *Vet. Microbiol.*, **121**, 45–55.

- CHAPMAN D.A., DARBY A.C., DA SILVA M., UPTON C., RADFORD A.D. & DIXON L.K. (2011). Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 599–605.
- COSTARD S., MUR L., LUBROTH J., SANCHEZ-VIZCAINO J.M. & PFEIFFER D.U. (2013). Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res.*, **173**, 191–197.
- DE LEÓN P., BUSTOS M.J. & CARRASCOSA A.L. (2013). Laboratory methods to study African swine fever virus. *Virus Res.*, **173**, 168–179.
- DE VILLIER E.P., GALLARDO C., ARIAS M., DA SILVA M., UPTON C., MARTIN R. & BISHOP R.P. (2010). Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*, **400**, 128–136.
- DIXON L.K., ESCRIBANO J.M., MARTINS C., ROCK D.L., SALAS M.L. & WILKINSON P.J. (2005). In: Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J, Desselberger U. & Ball L.A., eds. Elsevier/Academic Press, London, UK, 135–143.
- ESCRIBANO J.M., PASTOR M.J. & SANCHEZ VIZCAINO J.M. (1989). Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false positive reactions in the sero diagnosis of African swine fever. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 1118–1122.
- FERNÁNDEZ-PACHECO P., NIETO R., SIMÓN A., GARCÍA CASTEY T.A., MARTÍN E., ARIAS M. & GALLARDO C. (2016). Comparative evaluation of the performance of six ELISA tests for the detection of antibodies against African swine fever virus (ASFV). EPIZONE 10th Annual Meeting, 27–29 September 2016, p. 108.,
- FERNÁNDEZ-PINERO J., GALLARDO C., ELIZALDE M., RASMUSSEN T.B., STAHL K., LOEFFEN W., BLOME S., BATTEN C., CROOKE H., LE POTIER M.F., UTTENTHAL Á., LEBLANC N., ALBINA E., KOWALCZYK A., MARKOWSKA-DANIEL I., TIGNON M., DE MIA G.M., GIAMMARIOLI M., ARIAS M. & HOFFMANN B. (2010). EPIZONE ring trial on ASFV real-time PCR. Annual Meeting of National African swine fever Laboratories, 18 May 2010, Pulawy, Poland.
- FERNÁNDEZ-PINERO J., GALLARDO C., ELIZALDE M., ROBLES A., GÓMEZ C., BISHOP R., HEATH L., COUACY-HYMAN E., FASINA F.O., PELAYO V., SOLER A & ARIAS M. (2013). Molecular diagnosis of African Swine Fever by a new real-time PCR using universal probe library. *Transbound. Emerg. Dis.*, **60**, 48–58.
- GALLARDO C., FERNÁNDEZ-PINERO J., PELAYO V., GAZAEV I., MARKOWSKA-DANIEL I., PRIDOTKAS G., NIETO R., FERNÁNDEZ-PACHECO P., BOKHAN S., NEVOLKO O., DROZHZE Z., PÉREZ C., SOLER A., KOLVASOV D. & ARIAS M. (2014). Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, eastern and central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 1544–1547.
- GALLARDO C., MWAENGO D.M., MACHARIA J.M., ARIAS M., TARACHA E.A., SOLER A., OKOTH E., MARTÍN E., KASITI J. & BISHOP R.P. (2009). Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes*, **38** 85–95.
- GALLARDO C., NIETO R., SOLER A., PELAYO V., FERNÁNDEZ-PINERO J., MARKOWSKA-DANIEL I., PRIDOTKAS G., NURMOJA I., GRANTA R., SIMÓN A., PÉREZ C., MARTÍN E., FERNÁNDEZ-PACHECO P. & ARIAS M. (2015b). Assessment of African swine fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in Eastern European Union countries: How to improve surveillance and control programs. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 2555–2565.
- GALLARDO C., SOLER A., NIETO R., CARRASCOSA A.L., DE MIA G.M., BISHOP R.P., MARTINS C., FASINA F.O., COUACY-HYMAN E., HEATH L., PELAYO V., MARTIN E., SIMON A., MARTIN R., OKURUT A.R., LEKOLLOL I., OKOTH E. & ARIAS M. (2013). Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE internationally prescribed serological tests. *Vet. Microbiol.*, **162**, 32–43.
- GALLARDO C., SOLER A., NIETO R., SÁNCHEZ M.A.S., MARTINS E., PELAYO V., CARRASCOSA A., REVILLA Y., SIMON A., BRIONES V., SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. & ARIAS M. (2015a). Experimental Transmission of African Swine Fever (ASF) Low Virulent Isolate NH/P68 by Surviving Pigs. *Transbound. Emerg. Dis.*, **62**, 612–622.
- HAINES F.J., HOFMANN M.A., KING D.P., DREW T.W. & CROOKE H.R. (2013). Development and validation of a multiplex, real-time RT PCR assay for the simultaneous detection of classical and African swine fever viruses. *PLoS One*, **8** (7).
- KING D.P., REID S.M., HUTCHINGS G.H., GRIERSON S.S., WILKINSON P.J., DIXON L.K., BASTOS A.D.S. & DREW T.W. (2003). Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods*, **107**, 53–61.

LUBISI B.A., BASTOS A.D., DWARKA R.M. & VOSLOO W. (2005). Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Arch Virol.*, **150**, 2439–2452.

NIX R.J., GALLARDO C., HUTCHINGS G., BLANCO E. & DIXON L.K. (2006). Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch. Virol.*, **151**, 2475–244.

PASTOR M.J., ARIAS M. & ESCRIBANO J.M. (1990). Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1540–1543.

PASTOR M.J., LAVIADA M.D., SANCHEZ VIZCAINO J.M. & ESCRIBANO J.M. (1989). Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. *Can. J. Vet. Res.*, **53**, 105–107.

PORTUGAL R., COELHO J., HÖPER D., LITTLE N.S., SMITHSON C., UPTON C., MARTINS C., LEITÃO A. & KEIL G.M. (2015). Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis. *J. Gen. Virol.*, **96** (Pt 2), 408–419.

QUEMBO C.J., JORI F., VOSLOO W. & HEATH L. (2018). Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. *Transbound. Emerg. Dis.*, **65**, 420–431.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (1987). African swine fever diagnosis. *In: African Swine Fever*, Becker Y., ed. Martinus Nijhoff, Boston, USA, 63–71.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. & ARIAS M. (2012). African swine fever. *In: Diseases of Swine*, tenth Edition, Straw B., D’Allaire S., Mengeling W., Taylor D., eds. Iowa State University, USA, pp.396–404.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M., MARTINEZ-LÓPEZ B., MARTINEZ-AVILÉS M., MARTINS C., BOINAS B., VIAL L., MICHAUD V., JORI F., ETTER E., ALBINA E. & ROGER F. (2009). Scientific Review on African swine fever. CFP/EFSA/AHAW/2007/02, pp: 1–141.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M., MUR L., GOMEZ-VILLAMANDOS J.C. & CARRASCO L. (2015). An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J. Comp. Pathol.*, **152**, 9–21.

TIGNON M., GALLARDO C., ISCARO C., HUTET E., VAN DER STEDE Y., KOLBASOV D., DE MIA G.M., LE POTIER M.F., BISHOP R.P., ARIAS M. & KOENEN F. (2011). Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J. Virol. Methods*, **178**, 161–167.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Peste porcina africana (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE, <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>) Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la Peste porcina africana.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2019.