



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

## Aislamiento viral e identificación del virus de la peste porcina africana en monocitos periféricos

**Laboratorio de referencia para la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para la peste porcina africana**  
Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM)  
Centro de vigilancia sanitaria veterinaria (VISAVET)

### Contacto:

Prof. José Manuel Sánchez Vizcaíno  
[jmvizcaino@visavet.ucm.es](mailto:jmvizcaino@visavet.ucm.es)  
Av/ Puerta de Hierro s/n.  
28040 Madrid.

Tel: (34) 913944082  
Fax: (34) 913943908

# Aislamiento viral e identificación del virus de la peste porcina africana en monocitos periféricos

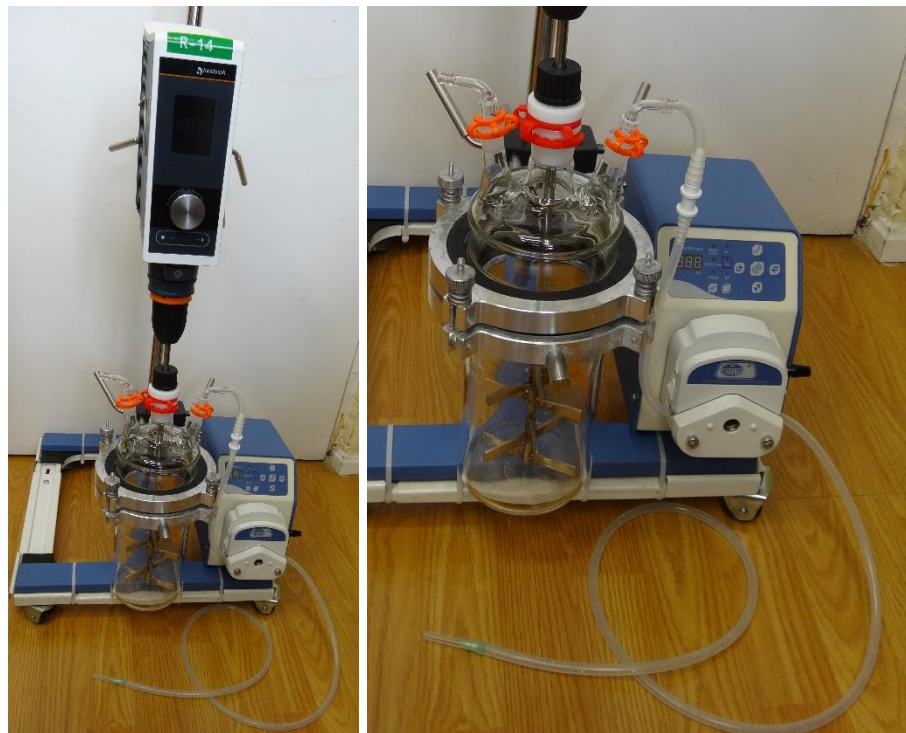
---

## 1. Aislamiento e identificación del virus

### 1.1 MATERIALES Y REACTIVOS

- Animal donante: cerdo doméstico o jabalí (*Sus scrofa*).
- Desfibrinador mecánico.
- Papel adsorbente.
- Cronómetro.
- Tubos de 50ml.
- Incubadora de CO<sub>2</sub> ( $\pm 0,5\%$ )/  $37\pm 3^{\circ}\text{C}$ .
- Cámara de contador [THOMA o NEUBAUER o características similares].
- Tubos Eppendorf de 1,5ml.
- Congelador  $< -10^{\circ}\text{C}$ .
- Congelador  $< -70^{\circ}\text{C}$ .
- Frigorífico  $4\pm 3^{\circ}\text{C}$ .
- Pipetas de vidrio o plástico para volúmenes de 1-25 ml.
- Guantes de látex o nitrilo.
- Cabina de flujo laminar clase II.
- Placa de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano [NUCLON™ Surface, NUNC o similares características].
- Pipeta multicanal de 50-300 l.
- Microscopio de cultivo celular invertido de contraste de fase.
- Medidor de pH (0,01 UpH).
- Pipetboy acu o equivalente.
- Incubadora con agitador  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Frasco de vidrio estéril de 250 ml y 500 ml.
- Pipetas monocanal 1-10  $\mu\text{l}$ .

- Pipetas monocal 10-100  $\mu$ l.
- Pipetas monocal 10-200 $\mu$ l.
- Pipetas monocal 200-1000 $\mu$ l.
- Centrífuga de mesa con refrigeración 4°C, Megafuge 1.0R [rotor Heraeus #7570 o de características similares].
- Vortex.
- Cloruro de Amonio NH<sub>4</sub>Cl [Ref.: 1.01145.1000 (Merck) o características similares]. Almacenar a 4°C.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS 1x) en comprimidos [Ref.: 524650-1 (CALBIOCHEM) o características similares]. Conservar a temperatura ambiente.
- Colorante de Türk. [Ref.: 1.09277.0500 (Merck) o características similares]. Conservar a temperatura ambiente.
- Control positivo: Aislado de HAD positivo al virus de la PPA. Almacenar a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$



**Figura 1.** Desfibrinador mecánico.

## 1.2 METODOLOGÍA:

### 1.2.1 EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE LEUCOCITOS:

- Obtención de sangre desfibrinada procedente de un cerdo o jabalí donante:
  - Sedar al animal.
  - Introducir la aguja con la que se realizará la extracción al tubo que conecta con el desfibrinador, previamente puesto en marcha (Figura 1).
  - Realizar la extracción de sangre a través del seno venoso oftálmico.
  - Una vez finalizada la extracción sanguínea, dejar la sangre durante 30 minutos dentro del desfibrinador con las aspas girando.

- Preparación de placas:

- **Reactivos:**

- Solución de lisis de eritrocitos: Cloruro de Amonio  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , estéril al 0.83% (8.3gr de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en 1 litro de agua destilada).

- Solución salina tamponada con fosfato: (PBS 1X, pH  $\pm 2$ ): Se pueden usar directamente los comprimidos (1 comprimido en 1 litro de agua destilada) o fabricarlo de la siguiente manera:

ClNa- -----	8gr
ClK -----	0.2gr
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K -----	0.2gr
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> -----	1.15gr
Agua destilada -----	1 litro

- Descartar el coágulo de fibrina que ha generado el desfibrinador.
      - Alicuotar la sangre que se encuentra en el desfibrinador en tubos de 50ml, estériles y dentro de una cabina de flujo laminar.
      - Centrifugar durante 30 minutos a 2.500rpm, **sin freno**.
      - Obtendremos tres fases: suero (medio de cultivo para los leucocitos), una fina capa blanca de leucocitos y una tercera fracción de eritrocitos.
      - Traspasar el suero a un bote de 250ml estéril y lo utilizaremos en el último paso como medio de cultivo.
      - Traspasar los eritrocitos a un tubo de 50ml y guardar a 4°C.
      - Traspasar los leucocitos a un tubo de 50ml y añadir 3 volúmenes de solución de lisis de eritrocitos.
      - Incubar en hielo durante 15 minutos.
      - Centrifugar a 2.000 rpm durante 15 minutos, **con freno**.
      - Descartar el sobrenadante, con cuidado y añadir, de nuevo, 3 volúmenes de la solución de lisis de eritrocitos.

- Incubar en hielo durante 15 minutos.
- Centrifugación a 2.000 rpm durante 15 minutos, **con freno**.
- Descartar el sobrenadante. Si el pellet contiene aún eritrocitos, realizar uno o dos lavados con PBS 1X (las centrifugaciones serán a 2.000rpm durante 10 minutos)
- Resuspender el pellet de leucocitos con 10ml del suero recogido anteriormente.
- Realizar el recuento leucocitario y ajustar la suspensión de leucocitos a una concentración final  $10^7$  leucocitos/ml, para ello utilizar la solución de Turk (5  $\mu$ l de suspensión de leucocitos + 495  $\mu$ l de solución de Turk).
- Distribuir los leucocitos en placas de 96 pocillos, 200  $\mu$ l por pocillo (300.000 células/pocillo).
- Incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 3-4 días.

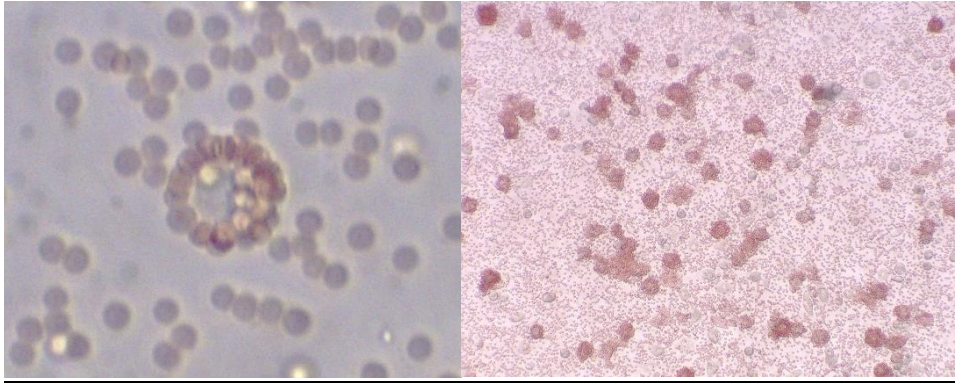
#### 1.2.2 INOCULACIÓN DE MUESTRAS Y CONTROLES:

- Pasados 3-4 días, realizar una dilución de los eritrocitos 1/100 en PBS 1X e inocular en cada pocillo 20  $\mu$ l de la dilución.
- Realizar una dilución 1/10 de cada muestra en el propio pocillo a ensayar (20  $\mu$ l/pocillo)
- Inocular 8 pocillos por muestra, dejando 8 pocillos libres entre muestra y muestra para evitar contaminaciones.
- Inocular el control positivo y control negativo.
- Sellar las placas con Parafilm.
- Incubar la placa de 96 pocillos a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 5-7 días para comprobar la presencia de hemadsorción (HAD) o efecto citopático (CPE).

#### 1.3 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

- Los pocillos inoculados se deben observar diariamente en el microscopio para revisar la presencia o no de hemadsorciones (HAD) y/o efecto citopático.
- La primera observación se puede realizar a las 14-16 horas después de la inoculación.
- Para la comprobar la presencia de HAD se deben agitar suavemente las placas antes de ser observadas al microscopio.
- El periodo de observación debe prolongarse hasta comprobar la presencia de HAD o efecto citopático hasta 7 días después de la incubación de muestras.
- Tras los 7 días, se realiza la extracción de genoma viral y PCR a tiempo real del sobrenadante del cultivo de leucocitos de la placa.

- Recogida de 10  $\mu$ l de la muestra o matriz biológica y se realiza un nuevo pase en una nueva placa con cultivo leucocitario ya preparado.
- Este procedimiento se lleva a cabo un total de tres veces, obteniendo así tres pases sucesivos de la muestra ambiental o matriz biológica en un cultivo de leucocitos.



**Figura 2.** Hemadsorción.

#### **Referencias Bibliográficas:**

1. Sánchez-Vizcaíno JM, Laddomada A, Arias ML. "African Swine Fever Virus," in *Diseases of Swine* (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 443–452. doi:10.1002/9781119350927.ch25
2. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres 2019 de la OIE. Capítulo 2.8.1 OIE, 2019. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.08.01\\_ASF.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf)