

ANEXO

«ANEXO IV

**PESTE EQUINA
DIAGNÓSTICO**

PARTE A

Pruebas serológicas

El método serológico descrito a continuación consiste en pruebas de inmunoabsorción enzimática (ELISA) basadas en el capítulo 2.5.1, sección B, punto 2, del Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, edición de 2016, adoptado por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2012.

La proteína vírica VP7 es un antígeno inmunodominante principal del virus de la peste equina (VPE) y se conserva en los nueve serotipos del VPE. Las proteínas VP7 recombinantes del VPE han mostrado ser estables, inocuas y adecuadas a la hora de utilizarlas como antígenos en procedimientos ELISA para detectar anticuerpos del VPE con una alta sensibilidad y especificidad (Laviada *et al.*, 1992b⁽¹⁾; Maree y Paweska, 2005). Las técnicas ELISA indirecta y ELISA de bloqueo son dos pruebas ELISA con la VP7 del virus de la peste equina adecuadas para el diagnóstico serológico de la peste equina (PE).

1. Técnica ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra el virus de la peste equina (VPE)

El conjugado empleado en este método es una gammaglobulina anti-caballo conjugada con peroxidasa de rábano que reacciona con suero de caballos, mulos y asnos. El método descrito por Maree y Paweska (2005)⁽²⁾ emplea la proteína G como conjugado que también reacciona con suero de cebra.

El Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), España, podrá proporcionar el antígeno en un plazo de entre 4 y 6 meses tras la petición.

1.1. Procedimiento de la prueba**1.1.1. Fase sólida**

1.1.1.1. Recubrir las placas de ELISA con VP7 recombinante de la cepa 4 del virus (VPE-4) diluida en solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Incubar las placas toda la noche a 4 °C.

1.1.1.2. Lavar las placas cinco veces con agua destilada que contenga 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solución de lavado). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

1.1.1.3. Bloquear las placas poniendo en cada pocillo 200 µl de solución amortiguadora salina fosfatada (PBS) pH 7,2 + 5 % (p/v) de leche desnatada (leche desnatada en polvo de NestléTM) y dejar una hora a 37 °C.

1.1.1.4. Eliminar la solución de bloqueo y golpear suavemente las placas contra un material absorbente.

1.1.2. Muestras problema

1.1.2.1. Diluir los sueros problema y los sueros control positivo y negativo al 1/25 en PBS + 5 % (p/v) de leche desnatada + 0,05 % (v/v) de Tween 20, hasta alcanzar un volumen de 100 µl por pocillo. Incubar una hora a 37 °C

Para la titulación, hacer una serie de diluciones a 1/2 desde 1/25 (100 µl por pocillo), con un solo suero por columna de la placa, y hacer la misma operación con los controles positivos y negativos. Incubar durante una hora a 37 °C.

⁽¹⁾ Laviada M.D., Roy P. y Sánchez-Vizcaíno J.M. (1992b). Adaptation and evaluation of an indirect ELISA and immunoblotting test for African horse sickness antibody detection. En: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium. Walton T.E. & Osburn B.L., Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 646-650.

⁽²⁾ Maree S. y Paweska J.T. (2005). Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7-based indirect ELISA for the detection of group-specific IgG antibodies in horse sera. J. Virol. Methods, 125 (1), 55-65.

- 1.1.2.2. Lavar las placas cinco veces con agua destilada que contenga 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solución de lavado). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.
- 1.1.3. Conjugado
 - 1.1.3.1. Poner en cada pocillo 100 µl de gammaglobulina anti-caballo conjugada con peroxidasa de rábano diluida en PBS + 5 % de leche + 0,05 % de Tween 20, pH 7,2. Incubar durante una hora a 37 °C.
 - 1.1.3.2. Lavar las placas cinco veces con agua destilada que contenga 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solución de lavado). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.
- 1.1.4. Cromógeno/sustrato
 - 1.1.4.1. Añadir a cada pocillo 200 µl de solución de cromógeno/sustrato [10 ml de solución 80,6 mM de DMAB (dimetil-aminobenzaldehído) + 10 ml de solución 1,56 mM de MBTH (clorhidrato 3-metil-2-benzotiazolina-hidrazona) + 5 µl H₂O₂].

La formación de color se detiene añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 3N tras unos cinco o diez minutos aproximadamente (antes de que el control negativo comience a tomar color).

Pueden utilizarse también otros cromógenos como ABTS [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], TMB (tetrametil-bencidina) u OPD (orto-fenildiamina).
 - 1.1.4.2. Leer las placas a 600 nm (o 620 nm).

1.2. Interpretación de los resultados

- 1.2.1. Calcular el valor del punto de corte añadiendo 0,06 al valor del control negativo (0,06 es la desviación típica derivada de un grupo de 30 sueros negativos).
- 1.2.2. Las muestras problema que presenten valores de absorbancia inferiores al punto de corte se consideran negativas.
- 1.2.3. Las muestras problema que presenten valores de absorbancia superiores al punto de corte + 0,15 se consideran positivas.
- 1.2.4. Las muestras problema que presenten valores de absorbancia intermedios se consideran no concluyentes, por lo que debe emplearse otra técnica para confirmar el resultado.

2. Técnica ELISA de bloqueo para la detección de anticuerpos contra el virus de la peste equina (VPE)

La técnica ELISA de bloqueo de competición está diseñada para detectar anticuerpos específicos contra el virus de la peste equina presentes en sueros de cualquier especie de équidos, es decir, caballos, burros, cebras y sus cruces, y evita el problema de la especificidad que a veces surge al utilizar técnicas ELISA indirectas.

El principio de esta prueba es bloquear la reacción que tiene lugar entre la proteína VP7 recombinante absorbida en una placa de ELISA y un anticuerpo monoclonal específico de VP7 de VPE conjugado. Los anticuerpos del suero problema bloquean la reacción entre el antígeno y el anticuerpo monoclonal, lo que se materializa en una reducción del color. Teniendo en cuenta que el anticuerpo monoclonal va dirigido contra la VP7, el ensayo presentará un alto nivel de sensibilidad y especificidad.

La técnica ELISA de bloqueo de competición está disponible en el comercio.

2.1. Procedimiento de la prueba

- 2.1.1. Fase sólida
 - 2.1.1.1. Recubrir las placas de ELISA con 50-100 ng de VP7 recombinante de la cepa 4 del virus (VPE-4) diluida en una solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Incubar durante toda la noche a 4 °C.
 - 2.1.1.2. Lavar las placas tres veces con solución salina amortiguadora fosfatada (PBS) 0,1x que contenga 0,135 M NaCl y 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

2.1.2. Muestras problema y controles

- 2.1.2.1. Diluir los sueros problema y los sueros control positivo y negativo a 1/5 en diluyente que contenga 0,35 M NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20 y 0,1 % Kathon, a razón de 100 µl por pocillo. Incubar durante una hora a 37 °C.

Para la titulación, hacer una serie de diluciones a 1/2 del suero problema desde 1/10 a 1/280 en 8 pocillos (100 µl por pocillo), con un solo suero por columna de la placa, y hacer la misma operación con los controles positivos y negativos. Incubar durante una hora a 37 °C.

- 2.1.2.2. Lavar las placas cinco veces con solución salina amortiguadora fosfatada (PBS) 0,1× que contenga 0,135 M NaCl y 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

2.1.3. Conjugado

- 2.1.3.1. Poner en cada pocillo 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-VP7 conjugado con peroxidasa de rábano. Este anticuerpo monoclonal debe diluirse previamente a 1/5 000–1/15 000 en una solución 1/1 de StabiliZyme Select® Stabilizer (SurModics. Referencia: SZ03) en agua destilada. Incubar treinta minutos a 37 °C.

- 2.1.3.2. Lavar las placas cinco veces con solución salina amortiguadora fosfatada (PBS) 0,1× que contenga 0,135 M NaCl y 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

2.1.4. Cromógeno/sustrato

Añadir a cada pocillo 100 µl de solución de cromógeno/sustrato, es decir, 1 ml de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] 5 mg/ml + 9 ml de solución amortiguadora de sustrato (solución amortiguadora fosfato/citrato 0,1 M de pH 4 que contenga 0,03 % H₂O₂) e incubar durante diez minutos a temperatura ambiente. Detener la formación de color añadiendo 100 µl/pocillo de SDS (dodecil-sulfato sódico) al 2 % (p/v).

2.1.5. Lectura

Leer los resultados a 405 nm en un lector ELISA.

2.2. Interpretación de los resultados

- 2.2.1. Determinar el porcentaje de bloqueo (BP) de cada muestra aplicando la siguiente fórmula, donde "Abs" significa anticuerpos:

$$BP = \frac{\text{Abs}(\text{control}^-) - \text{Abs}(\text{muestra})}{\text{Abs}(\text{control}^-) - \text{Abs}(\text{control}^+)} \times 100$$

- 2.2.2. Las muestras que presenten un valor de BP superior al 50 % se considerarán positivas para anticuerpos contra el VPE.

- 2.2.3. Las muestras que presenten un valor de BP inferior al 45 % se considerarán negativas para anticuerpos contra el VPE.

- 2.2.4. Las muestras que presenten un valor de BP comprendido entre el 45 % y el 50 % se considerarán no concluyentes y deberán volver a analizarse. Si el resultado vuelve a ser no concluyente, deberán volver a tomarse muestras de los animales, cuando hayan transcurrido al menos dos semanas desde la toma de las muestras que se hubieran considerado no concluyentes, y volver a analizarse.

PARTE B

Identificación del agente

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real)

Las pruebas de identificación del agente basadas en métodos de ácido nucleico deben detectar cepas de referencia de los nueve serotipos del virus de la peste equina.

El método descrito en el punto 2.1 se basa en el capítulo 2.5.1, sección B, punto 1.2, del Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, edición de 2016, adoptado por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2012.

Cualquier método de detección mediante la RT-PCR empleado para el análisis de muestras, tanto de sangre como del bazo, en el contexto de la Directiva 2009/156/CE debe igualar o superar la sensibilidad de las metodologías descritas en el punto 2.

Los virus inactivados de las cepas de referencia de los serotipos del 1 al 9 pueden obtenerse del Laboratorio de Referencia de la UE o del Laboratorio de Referencia de la OIE para la peste equina, Argel, España.

1. Extracción de ARN vírico

Para garantizar una buena reacción es necesario extraer de la muestra un ARN del VPE de calidad. La extracción de ácidos nucleicos de muestras clínicas puede llevarse a cabo mediante varios métodos internos y comercializados.

Los juegos comerciales utilizan enfoques diferentes para el aislamiento del ARN. La mayoría se basa en uno de los procedimientos siguientes:

- extracción de ácidos nucleicos con fenol-cloroformo,
- adsorción de ácidos nucleicos a un sistema de filtro,
- adsorción de ácidos nucleicos a un sistema de perlas magnéticas.

A continuación se expone un ejemplo de una extracción de ARN por un método interno:

- 1.1. Se homogeneiza 1 g de muestra de tejido en 1 ml de solución desnaturalizante (tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 M, sarcosil al 0,5 %).
- 1.2. Tras la centrifugación, se añade al sobrenadante 1 µg de ARN de levadura, 0,1 ml de acetato sódico 2 M y de pH 4, 1 ml de fenol y 0,2 ml de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (49/1).
- 1.3. La suspensión se sacude enérgicamente y se refrigera en hielo durante 15 minutos.
- 1.4. Tras la centrifugación, el ARN presente en la fase acuosa se extrae con fenol, se precipita con etanol y se resuspende en agua estéril.

2. Procedimiento de la RT-PCR en tiempo real

2.1. RT-PCR en tiempo real específica de grupo de Agüero et al., 2008 ⁽¹⁾

Esta RT-PCR en tiempo real específica de grupo está dirigida a la VP7 del VPE y permite detectar todos los serotipos y cepas del VPE conocidos actualmente circulantes. Además, se ha empleado con buenos resultados en los Laboratorios de Referencia nacionales de los Estados miembros de la Unión Europea que han participado en pruebas de aptitud organizadas anualmente por el Laboratorio de Referencia de la UE entre 2009 y 2015. Asimismo, en un estudio colaborativo internacional de 2015 organizado en el marco de la red de los Laboratorios de Referencia de la OIE, se otorgó un lugar destacado al presente Protocolo, entre otros.

Secuencias de sondas y de cebadores para la detección de especies del VPE:

- Cebador directo 5'-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3'
- Cebador inverso 5'-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3'
- Sonda Taqman con grupo MGB 5'-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3'

- 2.1.1. La solución madre del cebador se diluye hasta una concentración de trabajo de 8 µM ("solución de trabajo del cebador 8 µM"), mientras que la sonda se diluye a una concentración de trabajo de 50 µM ("solución de trabajo de la sonda 50 µM"). Debe diseñarse una disposición de las placas problema que se introducirá en el programa informático de la máquina de PCR en tiempo real. Utilizando esa disposición como guía, se añadirán 2,5 µl de cada solución de trabajo del cebador 8 µM a cada pocillo que vaya a contener muestras de ARN y controles positivos y/o negativos (la concentración final del cebador será de 1 µM en los 20 µl de la mezcla de reacción de RT-PCR). La placa se conserva en hielo.

⁽¹⁾ Agüero M., Gómez-Tejedor C., Ángeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. y Jiménez-Clavero A. (2008). Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 325-328.

- 2.1.2. Se mezclan 2 µl de ARN aislado (muestras problema y control positivo), o 2 µl de agua libre de ribonucleasa en los controles de reacción negativa, con los cebadores directo e inverso. Esta mezcla se desnaturaliza calentándola a 95 °C durante 5 minutos y, a continuación, se enfría rápidamente sobre hielo durante al menos 5 minutos.
- 2.1.3. Se prepara un volumen apropiado de mezcla de reacción de RT-PCR de un paso en tiempo real para el número de muestras que se van a analizar, según las instrucciones del fabricante. Se añade 0,1 µl de la solución de trabajo de la sonda 50 µM a cada pocillo que contiene muestras de ARN (la concentración final de la sonda será de 0,25 µM en cada pocillo que contenga muestras de ARN). En cada pocillo de la placa PCR que contenga los cebadores desnaturalizados y el ARN se distribuyen 13 µl de la mezcla de reacción de RT-PCR de un paso en tiempo real.
- 2.1.4. La placa se coloca en un termociclador en tiempo real programado para la transcripción inversa y la amplificación del ADNc/detección de fluorescencia. Las condiciones de amplificación consisten en un primer paso de transcripción inversa a 48 °C durante 25 minutos, seguido de 10 minutos a 95 °C (“arranque en caliente”) y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 35 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C (o 40 ciclos a 97 °C durante 2 segundos y 55 °C durante 30 segundos si se emplean reactivos y un termociclador que permitan reacciones rápidas). Se obtienen datos de fluorescencia al final del paso de 55 °C.
- 2.1.5. El ensayo se considera inválido si se obtienen curvas de amplificación atípicas, y debe repetirse.

Las muestras se consideran positivas si el valor Ct (el número de ciclos en el que la fluorescencia generada en una reacción supera el umbral de fluorescencia) es inferior o igual al umbral Ct definido (35) en 40 ciclos de PCR ($Ct \leq 35$).

Las muestras se consideran no concluyentes si el valor Ct es superior al umbral Ct definido (35) en 40 ciclos de PCR ($Ct \geq 35$).

Las muestras se consideran negativas si se obtiene una curva de amplificación horizontal que no supera el umbral en 40 ciclos de PCR.

2.2. RT-PCR en tiempo real específica de grupo de Guthrie *et al.*, 2013 ⁽¹⁾

La RT-PCR en tiempo real emplea sondas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para detectar ácidos nucleicos del VPE.

La prueba descrita de RT-PCR del VPE se diseñó empleando secuencias de una amplia variedad de cepas silvestres actualmente circulantes del VPE (Quan *et al.*, 2010 ⁽²⁾). También incorpora una prueba de control externo sintético patentado para comprobar el funcionamiento adecuado de los componentes de la prueba.

Los juegos para la PCR de un paso en tiempo real están disponibles comercialmente. A continuación se presentan algunos de los pasos básicos descritos por Guthrie *et al.* (2013), que pueden modificarse según los requisitos específicos de cada caso/locales, los juegos empleados y el equipo disponible.

Secuencias de sondas y de cebadores para la detección de especies del VPE:

- Cebador directo 5'-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3'
- Cebador inverso 5'-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3'
- Sonda Taqman con grupo MGB 5'-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3'

- 2.2.1. Las soluciones madre de mezclas de sondas y cebadores se realizan a una concentración 25×: a 5 µM para los cebadores directos e inversos y a 3 µM para la sonda. Debe diseñarse una disposición de placas de prueba que se introducirá en el programa informático de la máquina de PCR en tiempo real. Mediante el uso de la disposición como guía, se añadirán 5 µl de muestras de ARN, incluyendo las muestras problema y los controles positivo y negativo, a los pocillos de la placa apropiados según la disposición.
- 2.2.2. El ARN se desnaturaliza calentándolo a 95 °C durante 5 minutos, y, a continuación, se enfría rápidamente sobre hielo durante al menos 3 minutos.

⁽¹⁾ Guthrie AJ, MacLachlan NJ, Joone C, Lourens CW, Weyer CT, Quan M, Monyai MS, Gardner IA. Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *Journal of Virological Methods*. 2013;189(1):30-5.

⁽²⁾ Quan, M., Lourens, C.W., MacLachlan, N.J., Gardner, I.A., Guthrie, A.J., 2010. Development and optimisation of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay targeting the VP7 and NS2 genes of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods* 167, 45-52.

- 2.2.3. Se prepara un volumen apropiado de mezcla de reacción de RT-PCR de un paso en tiempo real para el número de muestras que se analizarán, según las instrucciones del fabricante. Se añade 1 µl de solución madre de mezcla de sondas y cebadores 25× (punto 2.2.1 anterior) en la mezcla de reacción para obtener una concentración final en cada pocillo de 200 nM para cada cebador y 120 nM para cada sonda. Se distribuyen 20 µl de la mezcla de reacción en cada pocillo de la placa PCR que contenga el ARN desnaturalizado.
- 2.2.4. La placa se coloca en un termociclador en tiempo real programado para la transcripción inversa y la amplificación del ADNc/detección de fluorescencia tal como sugieren los fabricantes. Las condiciones de amplificación consisten, por ejemplo, en una primera fase de transcripción inversa a 48 °C durante 10 minutos, seguida de 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 45 segundos a 60 °C.
- 2.2.5. Las muestras se consideran positivas si la fluorescencia normalizada para la prueba RT-PCR del VPE supera el umbral de 0,1 en menos de 36 ciclos de PCR con todas las réplicas de una muestra.

Las muestras se consideran no concluyentes si la fluorescencia normalizada para la prueba RT-PCR del VPE supera el umbral de 0,1 en entre 36 y 40 ciclos de PCR con alguna réplica de una muestra.

Las muestras se consideran negativas si la fluorescencia normalizada para la prueba RT-PCR del VPE no supera el umbral de 0,1 en 40 ciclos de PCR con todas las réplicas de una muestra y si la fluorescencia normalizada para la prueba de control externo sintético patentado supera el umbral de 0,1 en 33 ciclos de PCR.»
