

Estabilidad del virus de la peste porcina africana (PPA) en el suelo y opciones para mitigar el riesgo potencial de transmisión

JOLENE CARLSON¹, MELINA FISCHER², LAURA ZANI², MICHAEL ESCHBAUMER³, WALTER FUCHS², THOMAS METTENLEITER², MARTIN BEER^{2,4} Y SANDRA BLOME²

¹Friedrich-Loeffler Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

²Friedrich-Loeffler Institute.

³Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health.

⁴InfluenzaNRL.

Fuente: Carlson J, Fischer M, Zani L, Eschbaumer M, et al. Stability of African swine fever virus in soil and options to mitigate the potential transmission risk. Friedrich-Loeffler-Institut, Suedufer 10, 17493; Greifswald. Insel Riems, Alemania.

RESUMEN

Comprender la transmisión del virus de la peste porcina africana (PPA) en una población es esencial en las estrategias para minimizar la propagación del virus durante un brote. El virus de la peste porcina africana puede sobrevivir durante períodos prolongados en productos animales, en cadáveres y en el medio ambiente. Estudios recientes han demostrado que el jabalí muestra interés en los cadáveres animales en una etapa avanzada de descomposición, al igual que en el suelo donde alguna vez estuvieron los restos de un jabalí.

Si bien se han encontrado ácidos nucleicos de PPA en el medio ambiente alrededor de las granjas infectadas, los datos sobre la supervivencia del virus en el suelo son escasos. Se investigaron diferentes matrices de suelo enriquecidas con sangre positiva de jabalíes infectados con PPA para ver si el virus podía permanecer viable en el suelo debajo de los cadáveres infectados. Además, se probaron diferentes estrategias de mitigación que podrían usarse en las regiones afectadas. Como se esperaba, la detección del genoma del virus de la PPA fue posible durante todo el rango de días de muestreo. El pH, la estructura y la temperatura ambiente del suelo

desempeñaron un papel importante en la estabilidad del virus de la PPA. Este virus se observó en muestras procedentes de arena estéril durante al menos tres semanas, y de arena de playa ordinaria durante dos semanas. En el suelo del jardín, se encontró el virus durante una semana y en el suelo de un área pantanosa durante tres días, pero desapareció de dos suelos forestales ácidos. Todos los experimentos de mitigación de riesgos con ácido cítrico o hidróxido de calcio dieron como resultado una inactivación completa en nuestra configuración experimental.

En conclusión, la estabilidad del virus de la peste porcina africana es prácticamente inexistente en suelos forestales, pero bastante alta en suelos arenosos, como las playas. Sin embargo, dada la alta variabilidad, se debe considerar el tratamiento con desinfectantes de los puntos de recogida de cadáveres para una reducción adicional del riesgo. A este respecto, deben tenerse en cuenta la naturaleza biocida y la seguridad en el trabajo.

Palabras clave: virus de la peste porcina africana (PPA), estabilidad, suelo, desinfección, mitigación de riesgos.

INTRODUCCIÓN

En la última década, la peste porcina africana (PPA) ha alcanzado una propagación geográfica sin precedentes que afecta a los jabalíes y los cerdos domésticos en gran parte de Europa y Asia, así como en varias zonas de África (Dixon et al., 2020). La enfermedad notificable de los suidos puede ir acompañada de signos de fiebre hemorrágica viral en cerdos domésticos y jabalíes euroasiáticos (Sánchez-Vizcaino et al., 2015). El virus se transmite directamente entre el cerdo infectado y el jabalí por vía oro-nasal e, indirectamente, por ingestión de carne contaminada. También puede ser transmitido por vectores competentes; es decir, garrapatas del género *Ornithodoros*. Desempeñan un papel importante en África, pero solo en unas pocas áreas fuera de este continente (Costard et al., 2013). A pesar de su rango limitado de hospedadores y su potencial zoonótico inexistente, el impacto socioeconómico es alto (Gallardo et al., 2015). Durante los primeros años de la epidemia actual, que comenzó en Geor-



gia en 2007, las infecciones se observaron principalmente en granjas de cerdos con bioseguridad generalmente baja y con un contagio incidental a la población de jabalíes. Sin embargo, en la UE la infección sobrevivió en la población de jabalíes independientemente de los brotes en cerdos domésticos (Chenais *et al.*, 2019). Para la transmisión entre jabalíes, parecen jugar un papel crucial los cadáveres y el hábitat contaminado, junto con los humanos, como propagadores de larga distancia (Chenais *et al.*, 2019).

Hasta ahora, solo hay unos pocos casos en el brote europeo actual en los que la enfermedad fue completamente erradicada de la población de jabalíes de un país. Un caso es el de la República Checa, donde las medidas de control aplicadas con éxito se utilizan allí como guía para los esfuerzos en curso en otros lugares (Dixon *et al.*, 2020). El otro caso es el de Bélgica, que está muy cerca de quedar libre de peste porcina africana, ya que no se han detectado nuevos casos de jabalíes infectados (fasf.be, 2020). Ambos países siguieron la política de la UE para mantener el virus concentrado en una zona tanto como fuera posible. Una parte integral de la estrategia de control es buscar y eliminar los cadáveres como fuente potencial del virus. En este contexto, se planteó la cuestión de si el suelo bajo un cadáver de jabalí retirado debería también eliminarse o tratarse para evitar la transmisión del virus a otros jabalíes que transitan por ese suelo contaminado. Se demostró que en dicho suelo se puede detectar genoma viral (Arvo Viltrop e Imbi Nurmoja, comunicación personal) y para minimizar el riesgo de transmisión se debatió intensamente medidas físicas simples, como el aireamiento del suelo, pero también la aplicación de desinfectantes. Se consideraron

posibles opciones los desinfectantes comerciales y los productos de cal; es decir, cal viva y agua de cal (una solución acuosa de hidróxido de calcio). En consecuencia, nuestros experimentos comenzaron simplemente para establecer un protocolo para aislar el virus de las muestras de suelo, pero evolucionaron con el tiempo a medida que se obtuvieron más datos. Nos propusimos determinar los valores básicos de la estabilidad del virus en matrices de suelo y cómo se podría reducir la infectividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y modificaciones de los protocolos a lo largo del tiempo

Después de conocer que el suelo debajo de un cadáver puede ser positivo para el genoma del virus de la PPA, comenzó un estudio piloto basado en los protocolos existentes para el análisis de muestras de suelo. Durante estos experimentos, fue esencial mejorar continuamente nuestros métodos para aumentar la robustez y la sensibilidad de la detección del virus infeccioso de la peste porcina africana. En detalle, se logró aumentando los volúmenes de inoculación del virus y luego incrementando la sensibilidad y solidez de los métodos de detección de aislamiento de este virus. Además, para los tipos de suelos áridos fue necesario ajustar el volumen del medio utilizado para recuperar el virus del suelo. Durante el estudio, resultó que los macrófagos primarios porcinos eran demasiado sensibles a los efectos tóxicos de las matrices del suelo. Por lo tanto, cambiamos a una línea celular permanente de pulmón de jabalí (WSL). A diferencia de los macrófagos que no se dividen, estas >



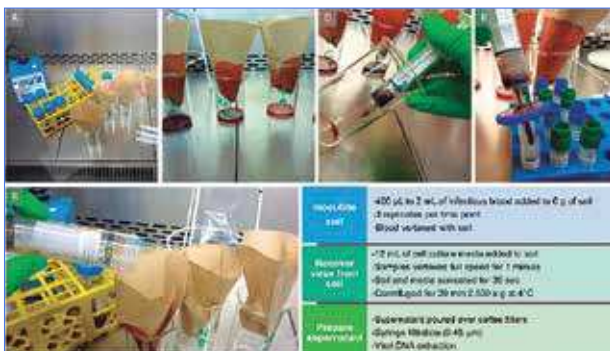
➤ células pueden dividirse rápidamente y parecen ser más resistentes a los efectos de la matriz del suelo estudiado. Al utilizar esta técnica de cultivo celular optimizada, tuvimos la ventaja de utilizar el genotipo IX de ASFV “Kenya1033” en el que el gen que codificaba el homólogo de CD2 viral se reemplazó por el de una proteína informadora fluorescente roja (Hubner *et al.*, 2018). Con las células WSL y el virus marcador, la detección de la replicación viral se aceleró a 5-7 días después de la titulación.

Recolección y análisis de suelo

Se recogió medio kilogramo de suelo de cada una de las cinco ubicaciones en Mecklemburgo-Pommerania Occidental, Alemania (ver *Figura 1*). Los tipos de suelo elegidos (suelo de jardín, dos tipos de suelo de bosque, barro de pantano y arena de playa), se ubicaban en lugares donde se encuentran comúnmente jabalíes. Además, se compró una bolsa de tierra para macetas para tener una matriz más controlada con un pH neutro, en comparación con las muestras recogidas de suelo forestal ácido, y se obtuvo arena de mar estéril de un proveedor de laboratorio (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania). Los suelos examinados fueron analizados por un laboratorio agrícola en Rostock, Alemania (Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt, LUFA). Ver *tabla 2*.

Descripción de los inóculos preparados para el enriquecimiento del suelo.

En los experimentos 1-3, se extrajo sangre completa de jabalíes infectados experimentalmente con el virus de la peste



porcina africana “Armenia 08”. Estos ensayos con animales se realizaron previamente para estudios de patogénesis. La sangre se mezcló durante 15-20 minutos con perlas de vidrio para eliminar la fibrina. Luego, la sangre se almacenó a -80° C hasta su uso. Dado que los experimentos se completaron en diferentes momentos, las reservas para agregar las matrices del suelo tenían diferentes títulos, pero no diferían más de un logaritmo en los volúmenes considerados. La sangre infectada del experimento 1 tenía un título de 7,25 log₁₀ dosis de hemadsorción al 50% (HAD₅₀) por ml, la sangre del experimento 2 tenía un título de 6,00 log₁₀ HAD₅₀/ml y la sangre del experimento 3 tenía un título de 7,00 log₁₀ HAD₅₀/ml.

Diseño experimental y modificaciones de los protocolos a lo largo del tiempo

Después de conocer que el suelo bajo un cadáver animal puede ser positivo para el genoma del virus, comenzamos un experimento piloto basado en los protocolos existentes para el análisis de muestras de suelo. Durante estos experimentos, fue esencial mejorar continuamente nuestros métodos para aumentar la robustez y la sensibilidad de la detección del virus infeccioso de la peste porcina africana. En detalle, lo logramos aumentando los volúmenes de inoculación del virus y luego aumentando la sensibilidad y solidez de los métodos de detección de aislamiento del patógeno. Además, para los tipos de suelos áridos fue necesario ajustar el volumen de medio utilizado para recuperar el virus del suelo. Durante el estudio, resultó que los macrófagos primarios porcinos eran demasiado sensibles a los efectos tóxicos de las matrices del suelo. Por lo tanto, cambiamos a una línea celular permanente de pulmón de jabalí (WSL). A diferencia de los macrófagos que no se dividen, estas células pueden dividirse rápidamente y parecen ser más resistentes a los efectos de la matriz. Al utilizar esta técnica de cultivo celular optimizada, tuvimos la ventaja de utilizar el genotipo IX de ASFV “Kenya1033” en el que el gen que codificaba el homólogo de CD2 viral se reemplazó por el de una proteína informadora fluorescente roja (Hubner *et al.*, 2018). Con las células WSL y el virus marcador, la detección de la replicación viral se aceleró a 5-7 días después de la titulación.

Recolección y análisis de suelo

Se recogió medio kilogramo de suelo de cada una de las cinco ubicaciones en Mecklemburgo-Pommerania Occidental, Alemania (ver *Figura 1*). Los tipos de suelo elegidos (suelo de jardín, dos tipos de suelo de bosque, lodo de pantano y arena de playa) se recogieron en lugares donde se encuentran comúnmente jabalíes. Además, se compró una bolsa de tierra comercial para macetas con el objetivo de tener una matriz más controlada con pH neutro, en comparación con las muestras recogidas de suelo forestal ácido (*Tabla 1*) y se obtuvo arena de mar estéril de un proveedor de laboratorio

(Carl Roth, Karlsruhe, Alemania). Los suelos recolectados fueron analizados por un laboratorio agrícola en Rostock, Alemania (ver *Tabla 2* en el material suplementario).

Descripción de los inóculos preparados para el enriquecimiento del suelo

En los experimentos 1-3, se extrajo sangre completa de jabalíes infectados experimentalmente con el virus de la peste porcina africana "Armenia 08". Estos ensayos con animales se realizaron previamente para estudios de patogénesis. La sangre se mezcló durante 15-20 minutos con perlas de vidrio para eliminar la fibrina. Luego, la sangre se almacenó a -80°C hasta su uso. Dado que los experimentos se completaron en diferentes puntos de tiempo, las reservas para agregar las matrices del suelo tenían diferentes títulos, pero no diferían más de un logaritmo en los volúmenes considerados. La sangre infectada del experimento 1 tenía un título de $7,25 \log_{10}$ dosis de hemadsorción al 50% (HAD_{50}) por ml, la sangre del experimento 2 tenía un título de $6,00 \log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{ml}$ y la sangre del experimento tres tenía un título de $7,00 \log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{ml}$.

EXPERIMENTO 1

Recuperación en macrófagos del virus de la PPA del suelo del jardín. Un experimento piloto

En un experimento piloto, se añadieron $400 \mu\text{l}$ de sangre infectada a 5g de suelo de jardín a un título de $7,25 \log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{ml}$ y se almacenaron a 4°C o 25°C . En este estudio, tanto la sangre como el suelo se analizaron en los intervalos de tiempo 0, 3, 6, 24, 48 y 72 h. Primero, se prepararon 5ml de medio de cultivo celular RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Alemania) con suero bovino fetal (FBS) al 10% y antibióticos al 2% (mezcla de penicilina-estreptomina Gibco, $10000 \text{U}/\text{ml}$; Thermo Fisher Scientific), añadido al suelo inoculado. Luego, la tierra se agitó en vórtex durante 45 segundos (consulte la *Figura 2* para ver todos los pasos). A continuación, el suelo y el medio se sonicaron durante 45 segundos a 4°C con los ajustes: ciclo de trabajo 40%, salida 3,5 con un *Branson Sonifier 450* (Heinemann Ultraschall- und Labortechnik; Schwäbisch Gmünd, Alemania). Después de la sonicación, la suspensión de suelo se centrifugó durante 30 minutos a $2.500 \times g$ a 4°C . El sobrenadante se vertió sobre un filtro de café, se impulsó a través de un filtro de jeringa de $0,45 \mu\text{m}$ (Millex Filter Units; Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irlanda) y el filtrado se almacenó a -80°C antes de la titulación.

EXPERIMENTO 2

Recuperación en macrófagos de arena estéril, arena de playa, lodo de pantano y suelo forestal

Las muestras de suelo recogidas se analizaron junto con dos controles: solo sangre y sangre mezclada con 6gramos de arena de mar estéril. Todos los suelos y controles se enrique-

cieron con $1,2 \text{ml}$ de sangre positiva a PPA con un título de $6,00 \log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{ml}$ y tres repeticiones por condición. Los suelos forestales estaban extremadamente secos, por lo que se agregaron 12ml de medio a todas las muestras para el aislamiento del virus. Continuamos el experimento 2 y los experimentos posteriores a temperatura ambiente (25°C), ya que no se habían visto grandes diferencias entre el suelo almacenado a 4°C o 25°C en el experimento 1. Limitamos nuestras pruebas a 14 días en el experimento 2 ya que parecía poco probable que se detectaran virus vivos más allá de una semana. Además del protocolo descrito en el experimento 1, también utilizamos un kit dedicado para la extracción de ADN del suelo (*DNeasy PowerSoil*; Qiagen, Hilden, Alemania) de $0,25 \text{gramos}$ de todas las matrices y en cada intervalo de tiempo.

EXPERIMENTO 3

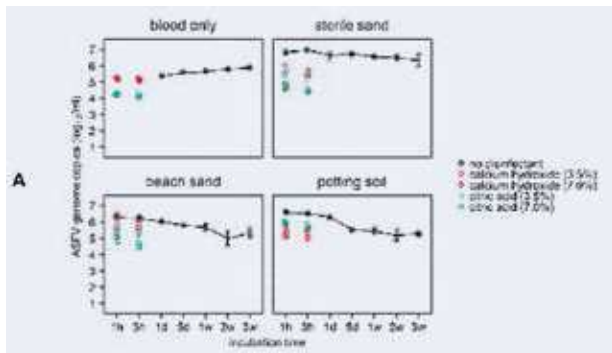
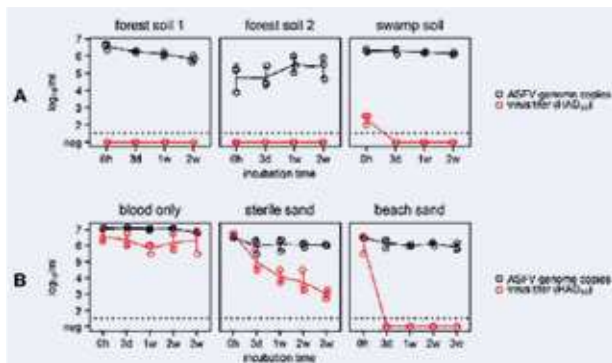
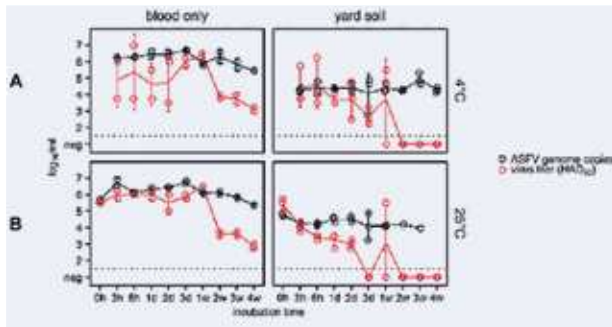
Recuperación en macrófagos de virus vivos de arena de la playa

El Experimento 2 se repitió con arena de playa y 2ml de sangre positiva a PPA con un título de $7,25 \log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{ml}$ a temperatura ambiente, debido a resultados de aislamiento del virus no concluyentes (datos no mostrados). Se utilizó un mayor volumen de sangre para aumentar las posibilidades de detección de virus en esta matriz que anteriormente arrojaba resultados mixtos. En el experimento repetido, se incluyeron como controles arena estéril y solo sangre. Cada condición experimental se completó con tres repeticiones.

EXPERIMENTO 4

Recuperación de virus vivos con cepa PPA Kenia y tratamientos de desinfección

Se preparó una reserva de virus mezclando 160ml de sobrenadante de células WSL infectadas con el virus PPA Kenia, con eliminación de CD2v adaptado a WSL con 500ml de sangre entera desfibrinada de un cerdo doméstico que dio como resultado un título final de PPA de $6,00 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Se utilizó un volumen de 2ml de sangre enriquecida para inocular 6g de arena de playa y tierra comercial para macetas a temperatura ambiente. De nuevo se incluyeron como controles un tubo de solo sangre y arena estéril. El protocolo se siguió como se describió anteriormente, con la omisión de la sonicación ya que las muestras eran demasiado numerosas como para utilizarla en los intervalos de 3 horas entre las tres primeras colecciones. Todas las condiciones de la muestra se completaron con tres repeticiones. Las muestras se trataron con hidróxido de calcio al 3,5% y 7,5% o ácido cítrico al 3,5% y 7,5% (por peso de suelo). Después de inocular cada matriz de suelo, se añadieron los desinfectantes en polvo, se agitaron en vórtex y se incubaron durante 1 o 3 horas a temperatura ambiente. ➤



➤ Aislamiento de virus en macrófagos porcinos y en células WSL

El aislamiento y la titulación del virus se completaron con macrófagos. Se extrajo sangre de cerdos domésticos sanos en tubos de heparina. La sangre completa se diluyó 1:1 en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se superpusieron 35 ml de sangre diluida sobre 12 ml de *Pancoll* (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania) y se centrifugaron a 730 xg durante 40 minutos a 20° C, con aceleración lenta y sin freno. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, en sus siglas en inglés), se recogieron y lavaron dos veces en y se pasaron sobre filtros de nailon de 70 µm para eliminar cualquier residuo graso. Para los pases ciegos, se cultivaron 5x10⁶ PBMC en cada pocillo de placas *Corning* de 24 pocillos (Corning, Durham, EE.UU.). Las titulaciones se completaron con 7,5 x 10⁶ células por ml en placas *Corning* de 96 pocillos (100 µl por pocillo; Corning, Durham, EE. UU.).

Las PBMC se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, antibióticos al

2%, mercaptoetanol 75 µL (Merck, Darmstadt, Alemania) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos de 2,5 ng/ml (GM-CSF; Biomol, Hamburgo, Alemania) durante el primer día, luego con 5 ng/mL de GM-CSF a partir del segundo día después de un cambio de medio. Se inoculó un volumen de 300 µl de sobrenadante de suelo por pocillo en una placa de 24 pocillos con 700 µl de medio. Al día siguiente, las células se lavaron con medio una vez y el sobrenadante de cada pocillo se reemplazó con 1 ml de medio fresco. Las células se cultivaron durante 5 días antes de congelarlas a -80° C para la titulación subsiguiente del virus. Se cultivaron células pulmonares de jabalí (WSL) con mezcla de nutrientes F-12 de Ham (Thermo Fisher Scientific), FBS al 10% y antibióticos al 2%. Para el aislamiento del virus, las células WSL se sembraron el día anterior con 10⁶ células por pocillo en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos (Corning, Durham, Estados Unidos). Se inoculó un volumen de 300 µL de sobrenadante de suelo en una placa de 24 pocillos con 700 µL de medio, y posteriormente se cambió al día siguiente y se reemplazó con 1 mL de medio fresco. Las células se cultivaron durante 5 días antes de congelarlas a -80° C para la titulación subsiguiente del virus. Las titulaciones se completaron con 4 x 10⁵ células WSL por ml utilizando 100 µl por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Corning, Durham, Estados Unidos).

Las células se inocularon con 100 µl de sobrenadante de aislamiento de virus de una ronda de amplificación de virus en la placa de 24 pocillos descrita anteriormente. Las titulaciones se completaron en diluciones de diez veces comenzando con 10⁻¹ a 10⁻⁸ y se calcularon mediante el método de Spearman-Kärber log₁₀, dilución de punto final al 50% con un límite de detección de 1,75 DICT₅₀/ml.

RESULTADOS

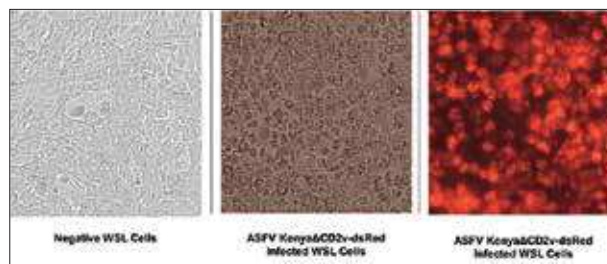
Recuperación de virus PPA del jardín en macrófagos (Experimento 1)

En este experimento piloto, el suelo del jardín se enriqueció con sangre de jabalí infectado con el virus de la PPA y se almacenó durante cuatro semanas a 25° C o 4° C. Se llevó a cabo un control solo de sangre en las mismas condiciones. Con respecto al control solo sangre almacenado a 4° C, se observó una alta variabilidad de los títulos de virus determinados durante las primeras 48 horas (*Figura 3*). Los títulos de las tres réplicas biológicas variaron entre 3,75 log₁₀ HAD₅₀/mL y 7,00 log₁₀ HAD₅₀/ml después de un tiempo de incubación de seis horas a 4° C. Tal variación no volvió a ocurrir en puntos de tiempo posteriores o en el control de sangre solamente almacenado a 25° C. En general, los títulos de virus en sangre pura disminuyeron claramente después de dos semanas de almacenamiento a cualquier temperatura. Sin embargo, los controles de solo sangre (4° C y 25° C) siguieron siendo infecciosos durante todo el período de observación.

Los títulos de virus en suelo de jardín enriquecido con sangre infecciosa y almacenado a 4° C o 25° C, generalmente disminuyeron en las primeras 72 horas (*Figura 3*). En suelo de jardín contaminado almacenado a 25° C no se detectó ningún virus infeccioso después de 72 horas. Sin embargo, después de una semana, se observó una alta variabilidad entre las réplicas biológicas en el suelo del jardín a ambas temperaturas de almacenamiento, con títulos de virus de hasta 5.50 \log_{10} HAD₅₀ / ml a 25° C. Por lo tanto, encontramos que el virus de la peste porcina africana permaneció infeccioso en el suelo del jardín (pH 6,7) hasta por 7 días a ambas temperaturas. Después de dos semanas, el suelo del jardín contaminado resultó claramente negativo para virus infecciosos hasta el final del estudio. Independientemente de la temperatura de almacenamiento, el número de copias del genoma de ASFV se mantuvo constante a lo largo del tiempo en el control de solo sangre y en las muestras de suelo de jardín.

Recuperación de virus de arena estéril, arena de playa, barro de pantano y suelo forestal en macrófagos. (Experimentos 2 y 3)

Se inocularon tres tipos de suelo diferentes (arena de playa, lodo de pantano, suelo de bosque) con sangre de un jabalí infectado con el virus de la peste porcina africana y se almacenaron a temperatura ambiente durante un máximo de tres semanas. Un control solo de sangre y arena estéril mezclada con sangre infecciosa se llevaron como controles del proceso en las mismas condiciones. En estos experimentos, los títulos de virus en sangre pura permanecieron estables durante el período de almacenamiento de tres semanas a temperatura ambiente y no se observó disminución en los títulos de virus después de dos semanas (*Figura 4*). Sin embargo, los títulos de virus en el control de arena estéril disminuyeron constantemente con el tiempo. No obstante, ambos controles del proceso (solo sangre y arena estéril) contenían virus infecciosos durante todo el período de observación. En arena de playa, se observaron títulos de virus altos entre 5.50 \log_{10} HAD₅₀ / mL y 6.50 \log_{10} HAD₅₀ / ml directamente después de la aplicación de sangre infecciosa (0h), pero no se pudo detectar ningún virus infeccioso en los tres días antes del final del experimento (*Figura 4*). Por el contrario, no se pudo recuperar ningún virus infeccioso de ninguna muestra de suelo forestal (pH 4.1 y 3.2), incluso inmediatamente después de la aplicación de sangre infecciosa. En el lodo de los pantanos (pH 5,1), sin embargo, se encontraron títulos residuales bajos directamente después de la adición de sangre infecciosa. Desde el tercer día hasta el final del período de observación, no se recuperó ningún virus infeccioso del lodo de los pantanos. Sin embargo, el genoma del virus de la PPA fue detectable en todos los tipos/matrices de suelo investigados y no se registró una disminución clara en el número de copias durante todo el período de observación.



Recuperación de virus Kenia de PPA infectado con eliminación de CD2v adaptado a WSL y tratamientos de desinfección (Experimento 4)

Para evaluar la técnica mejorada de cultivo celular usando células WSL, se inoculó arena de playa o suelo de jardín con sangre enriquecida con ASFV Kenia con eliminación de CD2v adaptado a WSL y se almacenó a temperatura ambiente durante tres semanas. Además, las diferentes matrices se trataron con dos desinfectantes diferentes durante una o tres horas. Se utilizó un control solo de sangre y arena estéril mezclada con sangre de ASFV infecciosa como controles de proceso en las mismas condiciones. Los títulos de virus en los controles de solo sangre y arena estéril permanecieron constantes durante todo el período de observación; no se observó disminución en el título de virus. Por tanto, la sangre no tratada o la arena estéril fueron infecciosas durante todo el intervalo de prueba de tres semanas. Sin embargo, la arena de playa y el suelo de jardín inoculados mostraron una disminución constante en el título de virus a lo largo del tiempo (durante la primera semana). Después de una semana, se observó una alta variabilidad entre las réplicas biológicas en la arena de la playa. Además, en ambos tipos de suelo, no se pudo detectar ningún virus infeccioso después de dos semanas de almacenamiento a temperatura ambiente. Sin embargo, el genoma del virus fue detectable en todos los tipos/matrices de suelo investigados y no se registró una disminución clara en el número de copias durante todo el período de observación.

DISCUSIÓN

La peste porcina africana ya no es una enfermedad exótica y ha establecido ciclos de transmisión complicados y autosostenidos en las poblaciones europeas de jabalíes. Se observa una propagación local lenta pero constante (datos del Sistema de notificación de enfermedades animales, mayo de 2020). Esto fue bastante inesperado ya que la experiencia histórica no indicó que el jabalí pudiera sostener un ciclo de infección endémica (*Laddomada et al., 1994*). Las observaciones de campo y los estudios experimentales indican una alta letalidad (*Blome et al., 2012, Gabriel et al., 2011*) y baja contagiosidad, especialmente en la fase inicial de un brote de peste porcina africana entre jabalíes. El bajo nivel de



➤ contagiosidad requiere un replanteamiento y un enfoque adaptado para controlar la PPA en la población de jabalíes (Depner *et al.*, 2016a, Depner *et al.*, 2016b). La evidencia sugiere que la peste porcina africana en una población de jabalíes tiende a comportarse más como una enfermedad a largo plazo ligada al hábitat sin tendencia a propagarse rápidamente. Son principalmente cadáveres infecciosos, combinados con la alta tenacidad del virus de la PPA y la baja contagiosidad los que pueden contener la enfermedad dentro de una región (Depner *et al.*, 2016b).

El suelo contaminado con el virus de la peste porcina africana causado por el jabalí es uno de los factores del hábitat que podría desempeñar un papel clave en la transmisión. Probst y col. (2017) informaron que los jabalíes muestran interés en el suelo donde se han encontrado cadáveres anteriormente, con cámaras de vida silvestre que documentan a los animales restregándose en el suelo incluso cuando solo quedan huesos. Además, colegas estonios y otros han demostrado genoma viral en estos suelos (Viltrop y Nurmoja, comunicación personal) (Zani *et al.*, 2020). En nuestro estudio, intentamos crear un conjunto de datos para una evaluación de riesgos del papel del suelo contaminado en la transmisión del virus de la peste porcina africana y las posibles medidas de mitigación.

Se demostró que la estabilidad del virus depende del tipo de suelo, pH, porcentaje de material orgánico y, en menor medida, de la temperatura ambiente. Si bien la arena contaminada retiene la infectividad durante semanas, la estabilidad del virus es muy baja en suelos forestales ácidos. Se encontraron tiempos intermedios en el barro de los pantanos y en el suelo de los jardines. Dentro de los límites de nuestra configuración experimental, y asumiendo que el animal es un sistema de

detección aún más sensible, no podemos descartar una persistencia de la infectividad durante al menos un par de semanas. La infectividad residual estuvo dentro del rango que se demostró ser infeccioso cuando se aplicó por vía oral a animales susceptibles (McVicar, 1984, Pietschmann *et al.*, 2015). Estos resultados contradicen en cierta medida estudios publicados anteriormente (Mazur-Panasiuk y Wozniakowski, 2020), donde el agua, el suelo y la hojarasca inactivaban rápidamente el virus de la PPA. En este estudio, Mazur-Panasiuk y Wozniakowski (2020) pudieron volver a aislar el virus del suelo y la hojarasca inmediatamente después de agregar el sobrenadante del cultivo a la matriz, pero incluso una breve incubación de tres días causó la pérdida completa de la infectividad del virus, independientemente de las condiciones de temperatura. Esto está en línea con los resultados obtenidos del lodo de los pantanos, pero no del suelo del jardín o la arena, donde se observaron períodos de infectividad mucho más largos. En contraste, volver a aislar inmediatamente después de agregar el contaminante al suelo del bosque fue imposible. Por tanto, la inactivación del virus parece ocurrir después de un breve contacto con la matriz, p. Ej. debido a las condiciones ácidas en ambos especímenes de suelo forestal (pH 4.1 y 3.2).

En conclusión, la estabilidad del virus de la PPA es muy baja en suelos forestales pero bastante alta en suelos arenosos. Dada la alta variabilidad de los hábitats de los jabalíes y los efectos imprevistos de la matriz de descomposición, se debe considerar el tratamiento de la ubicación de los cadáveres con desinfectantes al establecer las medidas de control. El formato en polvo de los productos químicos usados podría ser beneficioso y práctico. Sin embargo, se deben considerar las regulaciones sobre el uso de biocidas y la seguridad laboral.

El uso no autorizado de productos comerciales podría ser una alternativa. En este contexto, recientemente se demostró que los desinfectantes a base de peroximonosulfato de potasio (*Trifectant*, *Virkon S*) inactivaban el virus en superficies porosas (Gabbert *et al.*, 2020) pero tenían problemas con la sangre en determinadas circunstancias (Krug *et al.*, 2018).

La eliminación de los cadáveres positivos para el virus de la peste porcina africana es de suma importancia y sigue siendo una medida de control fundamental, ya que los virus vivos pueden permanecer infecciosos en determinadas matrices del suelo durante semanas.

Estos estudios establecen protocolos útiles para aislar el virus de la peste porcina africana de las matrices del suelo, al tiempo que brindan información sobre las posibles opciones de manejo útiles en el campo para mitigar la transmisión.

El artículo original con la bibliografía completa pueden leerse en:

<https://www.authorea.com/users/345604/articles/471773-stability-of-african-swine-fever-virus-in-soil-and-options-to-mitigate-the-potential-transmission-risk>

