# Uso de CRISPR/Cas en la peste porcina africana (PPA)

#### CRISTINA GÓMEZ LOZANO.

Veterinaria.

## **RESUMEN**

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad altamente contagiosa y letal de los cerdos para la que no existe ninguna vacuna ni ningún otro tratamiento curativo y que ocasiona importantes consecuencias socioeconómicas en la industria porcina. El miedo a nuevos brotes y a una mayor propagación del virus ha llevado a centrar las investigaciones en la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos y medidas que resulten efectivas. Así, el uso de técnicas de transgénesis, como es la tecnología CRISPR/Cas, ha conseguido resultados prometedores, tanto en el desarrollo de técnicas que permiten el diagnóstico in situ de forma sencilla y a bajo coste, como en su aplicación en la edición del genoma, que ha logrado inhibir la replicación del virus y obtener virus recombinantes con mayor eficacia que la obtenida en métodos tradicionales.

Palabras clave: virus, peste porcina africana, genoma, CRIS-PR/Cas9, CRISPR/Cas12.

## **INTRODUCCIÓN**

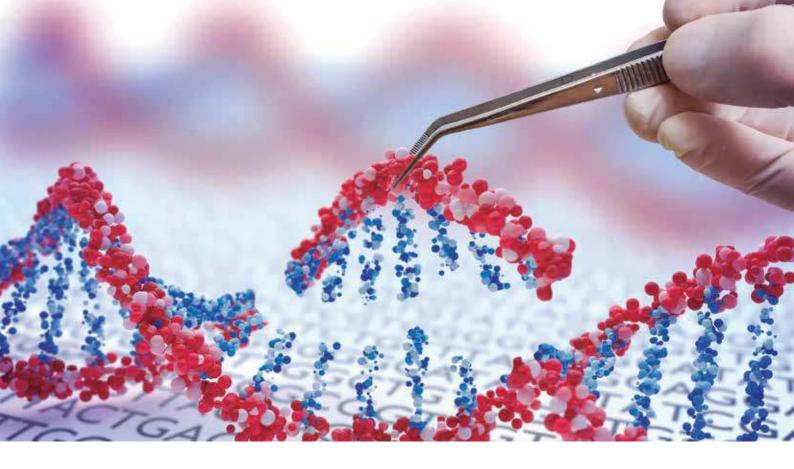
La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad contagiosa altamente letal causada por el virus de la peste

porcina africana, único miembro de la familia *Asfarviridae*, que ocasiona grandes pérdidas económicas y una enorme preocupación en la industria porcina mundial¹. Afecta tanto a cerdos domésticos como a cerdos salvajes² y puede desarrollarse de forma subclínica o letal dependiendo del huésped y de la cepa de la que se trate¹. En el caso de los cerdos domésticos y de los jabalíes, la tasa de mortalidad puede alcanzar el 100%, con una enfermedad febril y una hemorragia sistémica generalizada³, mientras que en las especies de cerdos salvajes africanos suele presentarse de forma subclínica².

Se trata de un virus complejo de doble cadena de ADN que contiene más de 150 de marcos de lectura abiertos codificados en un genoma de aproximadamente 180-190 pares de kilobases¹. Presenta un gran tamaño y está envuelto por una cápsula icosaédrica y una doble membrana². Su replicación tiene lugar fundamentalmente en el citoplasma de los macrófagos porcinos infectados, las principales células huésped⁴, pero también en algunas especies de garrapatas blandas, que constituyen un vector importante de transmisión y propagación del virus en África. De hecho, se mantiene en la naturaleza como consecuencia de la interacción entre cerdos salvajes africanos y las garrapatas blandas del género *Ornithodoros*⁵.

La PPA se describió por primera vez en Kenia a principios del siglo XX<sup>6</sup>. Actualmente es endémica en varios





países del África subsahariana y se ha introducido en Europa oriental, desde donde se está extendiendo a China y Europa occidental<sup>7</sup>. El problema recae en la falta de vacunas y de medidas de control eficaces, que hacen muy probable una mayor propagación<sup>6</sup>, por lo que un diagnóstico rápido y preciso de la infección es fundamental para controlar el virus<sup>8</sup>.

### **TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PPA**

La técnica gold standard de detección del genoma del virus de la PPA es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basada en la amplificación del marcador de ácido nucleico9, que presenta una alta sensibilidad y especificidad<sup>10</sup>. Sin embargo, debe realizarse en un laboratorio profesional cualificado con equipamiento de ciclo térmico y operarios capacitados, no siendo adecuada para la detección in situ ni para la detección rápida del virus, lo que retrasa el diagnóstico, aumentando las probabilidades de contagio8. Otras tecnologías actuales de diagnóstico molecular frente a la PPA presentan numerosas limitaciones en cuanto a su sensibilidad y especificidad, así como en su coste y rapidez, siendo necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan superar estas dificultades8. En este sentido, el sistema de detección de ácidos nucleicos basado en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas) se posiciona como un prometedor método de detección11. En lugar de necesitar ciclos térmicos, la detección basada en CRISPR/Cas puede realizarse a temperatura fisiológica o a temperatura ambiente, no necesita purificar y preparar la muestra y se produce a una tasa de división no específica muy alta, lo que facilita significativamente el procedimiento y reduce los costes<sup>12</sup>.

En este marco de investigaciones, aparece el ensayo CORDS (Cas12a- On-site and Rapid Detection System) para la detección del virus, que describe la lectura de franja de flujo lateral basado en RAA-Cas12, una combinación de la amplificación asistida por recombinación (RAA) con CRISPR/Cas12a. Presenta una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico en explotaciones y mataderos, sin necesidad de acceder a un laboratorio, obteniendo rápidamente los resultados, pues únicamente necesita una incubadora a 37º C. Además, los CORDS liofilizados pueden ser transportados y almacenados a largo plazo hasta su aplicación8. También en este contexto se desarrolla un método de detección sencillo, rápido y de bajo coste que emplea la tecnología CRISPR/Cas12a junto con la detección de flujo lateral (CRISPR/ Cas12a-LFD) para detectar el gen B646L de la PPA, sin necesidad de extraer el ADN, en un proceso isotérmico, aprovechando la alta sensibilidad y especificidad de CRISPR/Cas12a y la rapidez que aportan las tiras de prueba de flujo lateral, pudiendo completarse en una hora in situ<sup>13</sup>. Por otro lado, CRISPR/Cas12 también se ha combinado con un sistema de detección por fluorescencia sencillo que permite detectar el ADN del virus en todas sus fases en condiciones isotérmicas sin amplificación del ácido nucleico y con excelente sensibilidad y rendimiento<sup>12</sup>.

# MEDIDAS FRENTE LA PPA: EDICIÓN DEL GENOMA

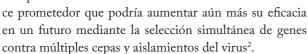
Hasta el momento, no se dispone de vacunas ni de medicamentos antivirales eficaces contra el virus de la PPA<sup>2</sup>. Por tanto, el desarrollo de virus recombinantes resulta esencial para conocer el papel de los diferentes genes en los procesos de replicación del virus, en la interacción

# ARTÍCULO CIENTÍFICO

De del virus con el hospedador y en el grado de virulencia¹. En este sentido, el sistema CRISPR/Cas9 se ha convertido en una poderosa herramienta en la edición del genoma de células eucariotas que permite eliminar o mutar genes virales específicos y generar organismos huéspedes resistentes eliminando genes de receptores celulares del virus o expresando ARN antivirales². Así, se ha informado recientemente del uso de esta tecnología como un sistema altamente eficaz para producir virus recombinantes de PPA, en el que se ha conseguido eliminar el gen no esencial 8-DR de una cepa de campo de gran virulencia y se ha sustituido por el gen de la proteína fluorescente roja (RFP). Esta modificación ocurre a una frecuencia mucho más alta que cuando se emplea la recombinación homó-

loga tradicional previamente descrita para la edición de virus de ADN<sup>1</sup>.

Una forma de transmitir resistencia a la infección que también pasa por la aplicación de CRISPR/Cas9 es el uso de esta tecnología para modificar el genoma del huésped y evitar así la replicación del virus. Esto se consigue mediante la expresión de un sistema de selección mediado por CRISPR/Cas9 dirigido a los codones 71-78 del gen esencial de la fosfoproteína viral p30 (CP204 L) por parte de las células del huésped. Se trata de un avan-



## **CONCLUSIONES**

La industria porcina podría sufrir importantes pérdidas económicas si se llegasen a producir nuevos brotes que condujesen a una mayor propagación de la enfermedad. La falta de medidas efectivas para prevenir y tratar la infección ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos enfoques. La aplicación de técnicas de transgénesis, como es la tecnología CRISPR/Cas, se presenta como una prometedora alternativa que necesita seguir siendo investigada en un futuro.

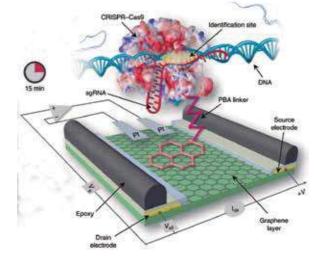
#### **REFERENCIAS**

1. Borca MV, Holinka LG, Berggren KA, Gladue DP. CRISPR-Cas9, a tool to efficiently increase the development of recombinant African swine fever viruses. *Sci Rep.* 2018;8(1): 3154.

- 2. Hübner A, Petersen B, Keil GM, Niemann H, Mettenleiter TC, Fuchs W. Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L). *Sci Rep.* 2018;8(1): 1449.
- 3. Blome S, Gabriel C, Beer M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res.* 2013;173(1):122-30.
- 4. Alcamí A, Carrascosa AL, Viñuela E. Interaction of African swine fever virus with macrophages. *Virus Res.* 1990;17(2):93-104.
- 5. Costard S, Mur L, Lubroth J, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeiffer DU. Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res.* 2013;173(1):191-7.
- 6. Arabyan E, Kotsynyan A, Hakobyan A, Zakaryan H.

Antiviral agents against African swine fever virus. *Virus Res.* 2019;270:197669.
7. Tait-Burkard C, Doeschl-Wilson A, McGrew MJ, Archibald AL, Sang HM, Houston RD, et al. Livestock 2.0 - genome editing for fitter, healthier, and more productive farmed animals. *Genome Biol.* 2018;19(1):204.

8. Bai J, Lin H, Li H, Zhou Y, Liu J, Zhong G, et al. Cas12a-Based On-Site and Rapid Nucleic Acid Detection of African Swine Fever. *Front Microbiol.* 2019;10:2830.



- 9. Gallardo C, Fernández-Pinero J, Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res.* 2019;271:197676.
- 10. Oura CA, Edwards L, Batten CA. Virological diagnosis of African swine fever--comparative study of available tests. *Virus Res.* 2013;173(1):150-8.
- 11. Li Y, Li S, Wang J, Liu G. CRISPR/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing. *Trends Biotechnol.* 2019;37(7):730-43.
- 12. He Q, Yu D, Bao M, Korensky G, Chen J, Shin M, et al. High-throughput and all-solution phase African Swine Fever Virus (ASFV) detection using CRISPR-Cas12a and fluorescence based point-of-care system. *Biosens Bioelectron*. 2020;154:112068.
- 13. Wang X, Ji P, Fan H, Dang L, Wan W, Liu S, et al. CRISPR/Cas12a technology combined with immuno-chromatographic strips for portable detection of African swine fever virus. *Commun Biol.* 2020;3(1):62.