


## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS PORCINAS

Sandra Barroso Arévalo  
José Manuel Sánchez Vizcaíno  
Universidad Complutense de Madrid- VISAVET  
OIE-ASF Reference Laboratory  
sandrabarroso@ucm.es  
jmvizcaino@ucm.es




### ¿El diagnóstico laboratorio es importante en las enfermedades infecciosas del porcino?

- a) No demasiado, con el cuadro clínico es suficiente para diagnosticar
- b) Solo es importante en las enfermedades de declaración obligatoria
- c) Sí, ya que hay muchas enfermedades que no se pueden identificar solo por el cuadro clínico
- d) Sí, ya que nos ayuda a tomar decisiones
- e) c y d son correctas



## PRINCIPALES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO** (detección de anticuerpos)

- ELISA
- Inmunofluorescencia indirecta
- Fijación del complemento

**DIAGNÓSTICO DEL AGENTE** (virus, bacteria, hongo...)

- Aislamiento bacteriano
- Aislamiento viral

**DETECCIÓN DEL ANTÍGENO**

- PCR
- ELISA de Ag
- AFA




**CASO CLÍNICO**  
¿DE QUÉ SOSPECHAMOS?

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**  
Tipo de muestra según la sospecha

**TOMA DE MUESTRAS**  
Indicar al laboratorio nuestra sospecha!!!

**ENVÍO AL LABORATORIO**

En función de lo que les hayamos indicado → **SELECCIÓN DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA**


**RESULTADO E INTERPRETACIÓN**

**TOMA DE DECISIONES**





## TOMA DE MUESTRAS

La calidad de la muestra es determinante para el diagnóstico  
La selección de la muestra dependerá de la prueba que se pretende realizar




Historia clínica




Signos clínicos

¿Qué prueba seleccionar?



### ¿Qué animales deberíamos seleccionar para el muestreo?

- a) Animales con cuadro agudo
- b) Animales sin síntomas
- c) Animales que se han recuperado del cuadro clínico
- d) Dependerá de la prueba que vayamos a hacer y la enfermedad de la que sospechemos



### TOMA DE MUESTRAS

**SELECCIÓN DE ANIMALES:**

- Animales que no hayan sido tratados con antibióticos
- Animales con cuadro agudo: detección del agente

**TIPOS DE MUESTRAS**  
Dependerá de la enfermedad de la que sospechemos

- Fetos
- Necropsias
- Hisopos nasales
- Sangre y suero
- Fluidos corporales
- Órganos
- Heces

**ANTE LA DUDA DE UNA ENFERMEDAD DE DECLARACIÓN OBLIGATORIA!!!**

LLAMAR AL VET OFICIAL



### PRESERVACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS

Generalmente en refrigeración (4° C)  
Aislamiento viral → congelado a -20° C

Bacteriología < 3h  
Virología < 8h

1. Inoculación primario estanco
2. Envasado secundario estanco
3. Envoltorio exterior

**ESCRITO AL LABORATORIO INDICANDO LA SOSPECHA!!!**



### PRINCIPALES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO** (detección de anticuerpos)

- ELISA
- Inmunofluorescencia indirecta
- Fijación del complemento

**DIAGNÓSTICO DEL AGENTE** (virus, bacteria, hongo...)

**AI SLAM IENTO DEL AGENTE**

- Aislamiento bacteriano
- Aislamiento viral

**DETECCIÓN DEL ANTÍGENO**

- PCR
- ELISA de Ag
- AFA



### AISLAM IENTO BACTERIANO

Cada bacteria tiene unas condiciones particulares de crecimiento → selección del medio de cultivo:

- Simplex, enriquecidos, selectivos, diferenciales, enriquecimiento
- Agar nutritivo, agar sangre, agar MacConkey, agar EMB, agar AMS, caldo nutritivo

*Haemophilus parasuis*

- Microaerofilia
- Agar chocolate

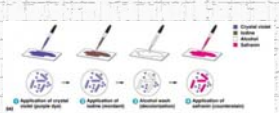
*Streptococcus suis*

- Anaerobiosis
- Agar sangre




### AISLAM IENTO BACTERIANO



**TINCIÓN DE GRAM**



**PRUEBAS BIOQUÍMICAS**



**ANTIBIOGRAMA**

### PRINCIPALES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO** (detección de anticuerpos)

- ELISA
- Inmunofluorescencia indirecta
- Fijación del complemento


**DIAGNÓSTICO DEL AGENTE** (virus, bacteria, hongo...)

**AI SLAM IENTO DEL AGENTE**

- Aislamiento bacteriano
- Aislamiento viral

**DETECCIÓN DEL ANTÍGENO**

- PCR
- ELISA de Ag
- AFA



### ELISA (DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO)

- o Técnica que detecta la presencia de Ac específicos
- o Permite analizar un gran nº de muestras
- o Rápida (alrededor de 3 horas)

### ¿Para qué se utiliza el diagnóstico serológico mediante ELISA?

- Para conocer si un animal ha estado expuesto a una enfermedad
- Como soporte para el diagnóstico
- Para comprobar que una vacuna ha sido efectiva
- Para hacer seroperfiles
- Todas son correctas

### ELISA (DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO)

#### PRINCIPALES USOS

- Vigilancia para detección de exposición a enfermedad
- Monitoreo de la respuesta a las vacunaciones
- Soporte para el diagnóstico

### PRINCIPALES ELISAS EN SEROLOGÍA

#### ELISA INDIRECTO

#### ELISA INDIRECTO DE COMPETICIÓN

### PRINCIPALES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

- DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO (detección de anticuerpos)**
  - ELISA
  - Inmunofluorescencia indirecta
  - Fijación del complemento
- DIAGNÓSTICO DEL AGENTE (virus, bacterias, hongos...)**
  - AISLAMIENTO DEL AGENTE
    - Aislamiento bacteriano
    - Aislamiento viral
  - DETECCIÓN DEL ANTIGENO
    - PCR
    - ELISA de Ag
    - AFA

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

- o Técnica que amplifica fragmentos de ADN específicos para permitir su detección y cuantificación
- o Se basa en la capacidad de la ADN polimerasa para replicar hebras de ADN, gracias a la utilización de unos cebadores/primers que aportan especificidad a la técnica

Componentes de la PCR: Muestra, Primers (ESPECIFICIDAD), Master mix (ready to use)

### CEBADORES/PRIMERS: ESPECIFICIDAD

Los PRIMERS son secuencias corta de ADN específicos para el genoma que queremos amplificar y que permiten que la polimerasa sintetice nuevas cadenas de ADN.

5' - TTAGACCCACCCCTCCTGGGGGCACACCCCTACTGACCCAC  
 3' - AATCTGGTGGGGAGGACCCCGGTGGGGGATGACTGGGTG  
 PRIMER FORWARD

5' - TTAGACCCACCCCTCCTGGCG-3'  
 3' - NCAGATGGTCAGAGTGGTC-5'  
 PRIMER REVERSE

86 bp

DISEÑO ESPECÍFICO PARA EL AGENTE QUE QUERAMOS DETECTAR

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

- Técnica muy sensible y específica
- Rápida y robusta
- Permite trabajar con material no infeccioso
- Útil para múltiples enfermedades

DETECTA MATERIAL GENÉTICO, NO INFECCIOSO!!!

### PASOS DE LA PCR

1. DESNATURALIZACIÓN
2. ANILLAMIENTO
3. ELONGACIÓN

### PASOS DE LA PCR

... 35 ciclos

**Amplificación exponencial**

### TIPOS DE PCR

PCR CONVENCIONAL	PCR REAL TIME
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Herramienta cualitativa</li> <li>○ Análisis del producto (fase final)</li> <li>○ Menos sensible (poca resolución)</li> <li>○ Cuantificación semicuantitativa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Monitorización de la cinética de la reacción</li> <li>○ Permite cuantificar</li> <li>○ Más rápida</li> <li>○ Más sensible y específica</li> </ul>

Gel de electroforesis

Fluorescencia

### REAL TIME PCR

¿Cómo detectamos la fluorescencia en la PCR en tiempo real?

SONDA

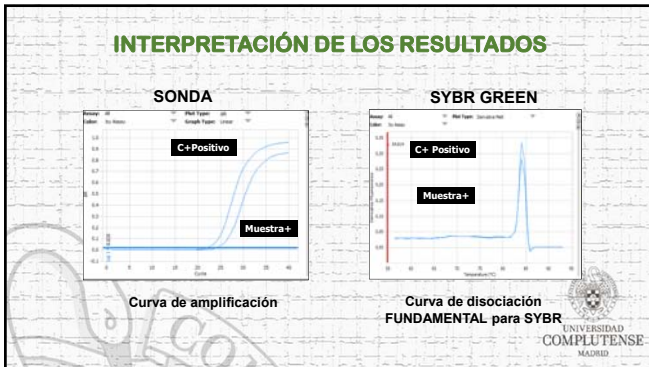
SYBR GREEN

1 Desnaturalización

2 Annealing

3 Extension

↑ ESPECIFICIDAD ↓  
 ↑ COSTE ↓




### ¿Cuál es la principal ventaja de la PCR frente a otras técnicas como el aislamiento bacteriano/viral?

- a) La PCR da un resultado más fiable
- b) La PCR es más rápida
- c) La PCR es más económica
- d) Todas son correctas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

### CASO CLÍNICO

- Explotación de engorde de **370 cerdas en fase 1**, situada en una zona de elevada densidad porcina de la Bretaña francesa.
- La reposición es de **origen externo**, realizándose una cuarentena en una nave a 200 m del núcleo central de la explotación.
- Las cerdas permanecen en la cuarentena un periodo mínimo de 45 días
- La explotación la lleva una ganadera que es extremadamente rigurosa desde el punto de vista de **bioseguridad interna** = gestión de las agujas y manejo hacia adelante.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

### CASO CLÍNICO

**Estatus sanitario**

- PRRS: negativa tras la repoblación.
- *Actinobacillus pleuropneumoniae*: negativo para los serotipos 2 y 1-9-11.
- Enfermedad de Aujeszky: negativo.
- *Mycoplasma hyopneumoniae*: ausencia de clínica tras la repoblación.
- Sarna sarcóptica: positiva

**Profilaxis realizadas**

- *E. coli*.
- Mal rojo.
- Clostridiosis.
- Ivermectina.



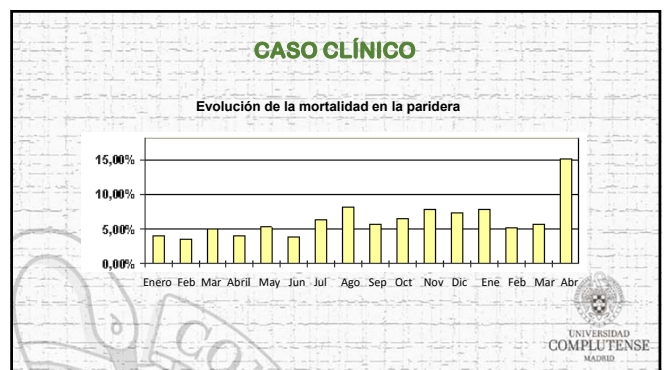
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

### CASO CLÍNICO

**Aparición del caso:**  
El ganadero se pone en contacto con el veterinario debido a la aparición de un brote agudo de diarreas en los lechones lactantes. La diarrea es acuosa y amarillenta.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID



### ¿Qué más preguntaríamos a la ganadera?

- a) ¿Ha tenido alguna vez problemas parecidos?
- b) ¿Hay problemas en algún otro área de la explotación?
- c) ¿Ha puesto algún tratamiento?
- d) Todas son correctas.



### CASO CLÍNICO

#### ¿Ha tenido problemas parecidos?

Sí, hace unos años tuvo diarreas en el destete que remitieron con el antibiótico.

#### ¿Hay problemas en algún otro área de la explotación?

Sí, alguna reproductora ha tenido algún aborto y hay mortinatos. Además, ha observado que las cerdas de la última reposición no están comiendo demasiado.

#### ¿Ha puesto algún tratamiento?

Enrofloxacina a 5mg/kg/día

Visitamos la explotación y encontramos que una de las cerdas de reposición nulpara ha muerto!



### ¿De qué enfermedad sospechamos?

- a) Parvovirus
- b) PRRS
- c) Enfermedad de Aujeszky
- d) Brucelosis
- e) Peste porcina africana



### ¿Qué muestras tomarías y para qué?

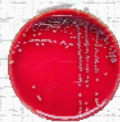
- a) Hisopos nasales para bacteriología
- b) Muestras de sangre y suero para serología y PCR
- c) Heces diarreas para bacteriología
- d) Restos de abortos para bacteriología y PCR
- e) Necropsia de la cerda muerta para PCR



### CASO CLÍNICO

HECES  
DIARREICAS

Aislamiento bacteriano



*E. coli*  
¿significación  
clínica?

MUESTRAS DE SUERO  
DE REPRODUCTORAS

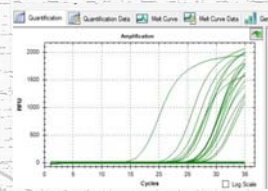
ELISA para detección de PRRS



### CASO CLÍNICO

NECROPSIA

Hacemos PCR para detección de PRRS  
RT-qPCR con SYBR Green!!!



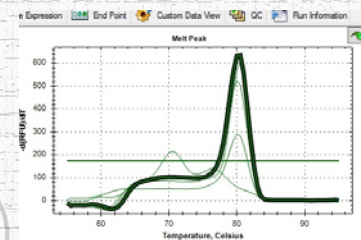
### ¿Cuál es el resultado de la PCR?

- La cerda es positiva a PRRS
- La cerda es negativa a PRRS
- No puedo asegurar ningún resultado sin ver la curva de disociación



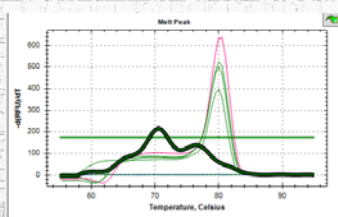
### CASO CLÍNICO

#### Curva de disociación



### CASO CLÍNICO

#### Curva de disociación



### ¿Qué haríamos en la granja?

- Poner tratamiento antibiótico para prevenir complicaciones respiratorias
- Introducir nuevas primerizas
- Vacunar frente a PRRS
- Cerrar la entrada a primerizas y sacrificar lechones enfermos



### CASO CLÍNICO

#### Medidas de control

- Hacer cambios y adopciones de lechones sólo durante las primeras 24 horas de vida
- No mover lechones ni cerdas entre salas de partos
- Minimizar los procesos con los lechones, especialmente con tratamientos rutinarios de antibióticos o inyecciones extras de hierro
- Sacrificar inmediatamente aquellos lechones que aparezcan enfermos o sean irrecuperables
- Detener cualquier práctica de feed-back con las cerdas
- Los destetes deben de manejarse estrictamente todo dentro todo fuera. Dejar 2 ó 3 días las salas vacías tras limpiar y desinfectar
- Introducir animales centinela cuando se haya controlado el proceso y hacer serología



### MUCHAS GRACIAS! ¿ALGUNA PREGUNTA?

