

¿Qué es?



porkaméricas
XX congreso internacional
2022



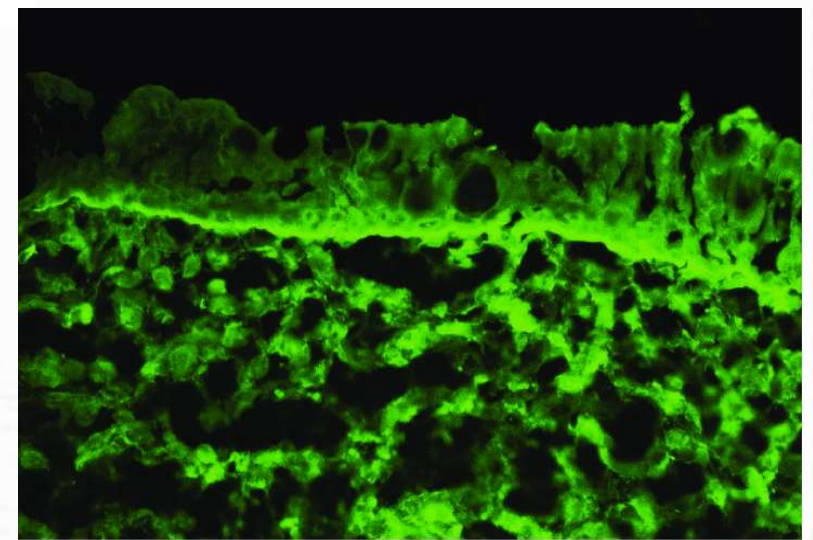
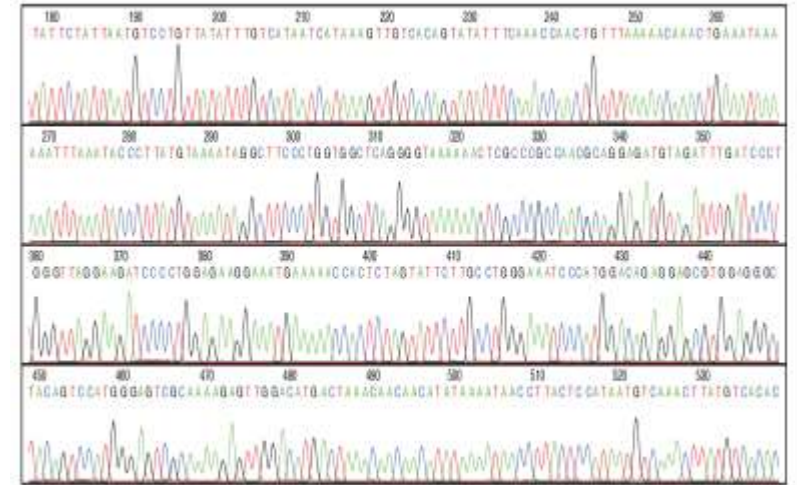
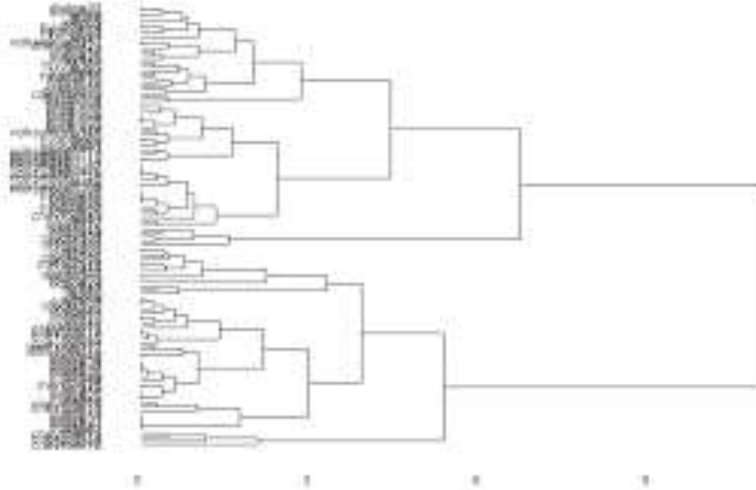


- Empieza la colección de la historia clínica (anamnesis).
- Revisión de signos clínicos.
- Evaluación del ambiente.
- Si no hay necropsias, hay que realizarlas.
- Se recolectan los respectivos órganos y tejidos.
- Se plantea un diagnóstico presuntivo.
- Se solicitan las respectivas **pruebas de laboratorio**.
- Se genera un plan de acción y se resuelve el problema.

¿Qué órgano? y ¿Qué prueba Selecciono para confirmar?



porkaméricas
XX congreso internacional
2022





porkaméricas
XX congreso internacional
2022

MVZ MC Raúl González

Ponga la biología
molecular para la
salud de su
granja





COMUNICADO (Nota Aclaratoria)

Esta es la versión de un usuario;

La versión de un veterinario de campo, no de un experto en pruebas de diagnóstico que trabaja en granjas y no en un laboratorio pero que utiliza las herramientas diagnósticas disponibles para la resolución de los problemas cotidianos de las empresas porcinas.

¿Qué tejidos o “cosas” selecciono para el Dx?



porkaméricas
XX congreso internacional
2022

1. Suero
2. Órganos (respiratorios, digestivo, etc)
3. Fluidos orales
4. Fluidos de proceso (Derivados de la castración y cortes).
5. Orina
6. Heces
7. Calostro
8. Leche
9. Toallas (trapos) de arrastre.
10. Insectos
11. Aves
12. Objetos inanimados (fómites).
13. Ambiente (colectores de polvo)
14. Alimento
15. Otros animales (jabalíes).
16. Fiambres, embutidos, carne

¿Qué pruebas selecciono para el Dx?



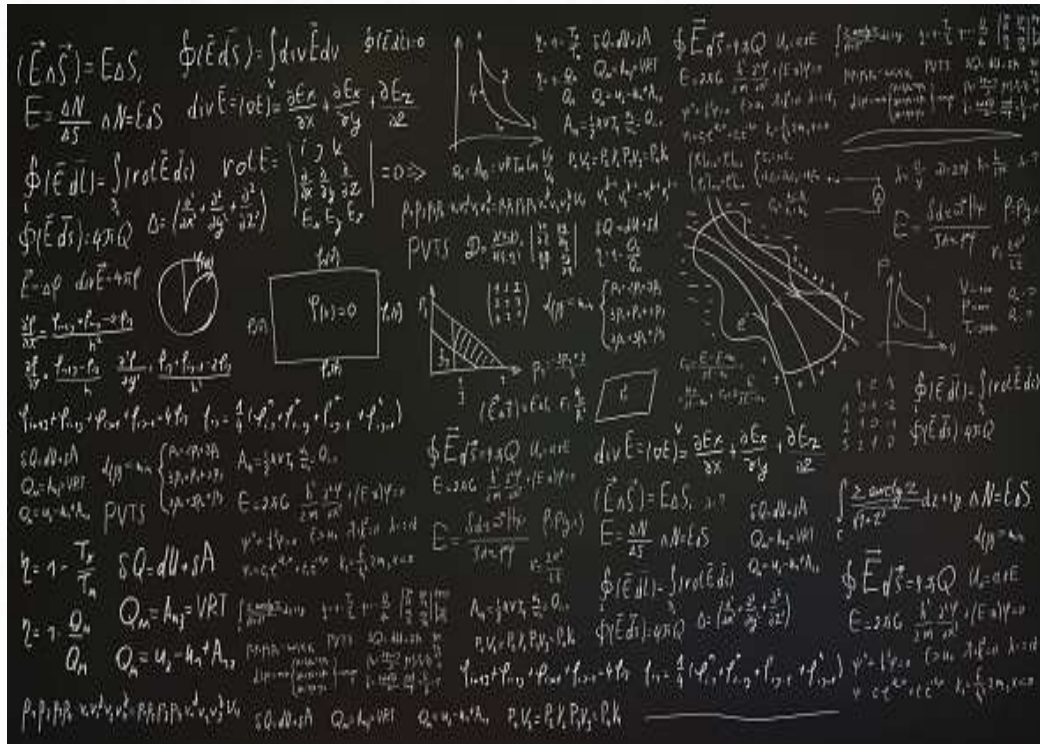
porkaméricas
XX congreso internacional
2022

1. ELISA con sus variantes
2. Inhibición de la hemoaglutinación
3. Microaglutinación en placa
4. Inmunofluorescencia
5. Inmunohistoquímica
6. Histopatología
7. Hibridación *in situ*
8. Identificación de parásitos.
9. Microscopía electrónica
10. Fijación del complemento
11. Aislamiento bacteriano
12. Aislamiento viral
13. PCR's y variantes
14. RFLP
15. Secuenciación
16. Hibridación de sondas de ADN
17. Pirosecuencia
18. Polimorfismo Ampliado aleatorio (RAPD)

Casi al 100% seguro me faltaron pruebas pero...



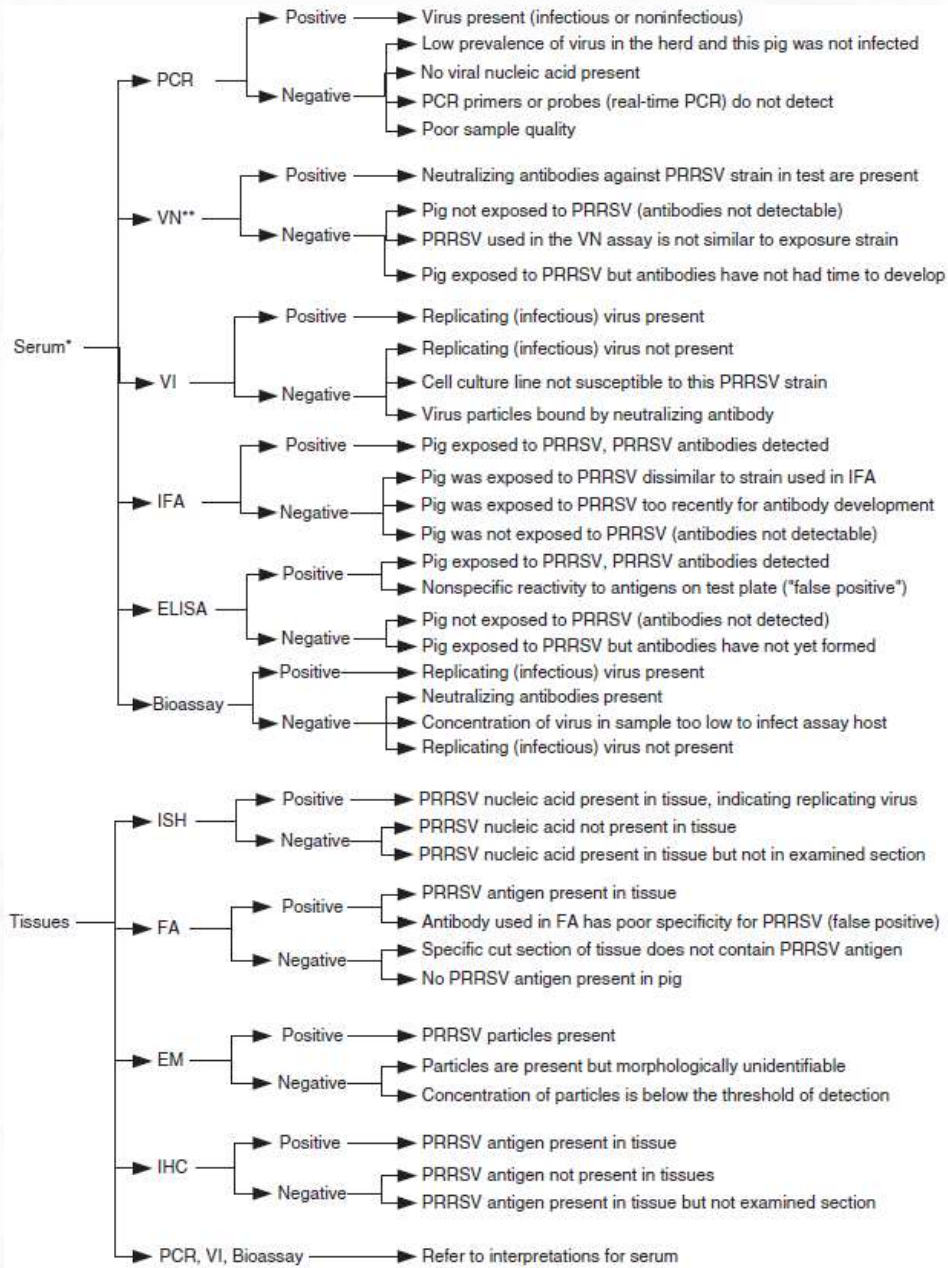
¿entonces?



16x18= 288 combinaciones

Hazlo fácil...

$$2 + 2 =$$



Pruebas (18<)

Antígeno
(virus, bacteria
o parásito)

Anticuerpo





Pruebas de biología molecular más usadas

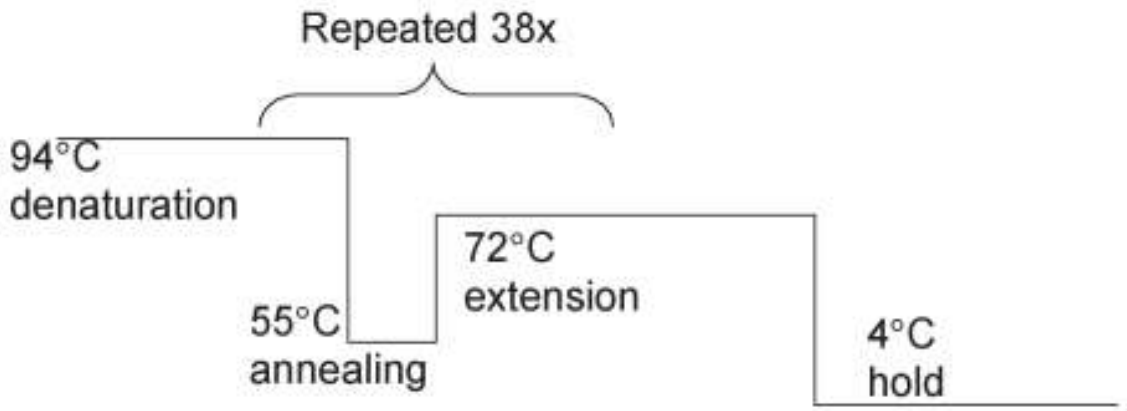
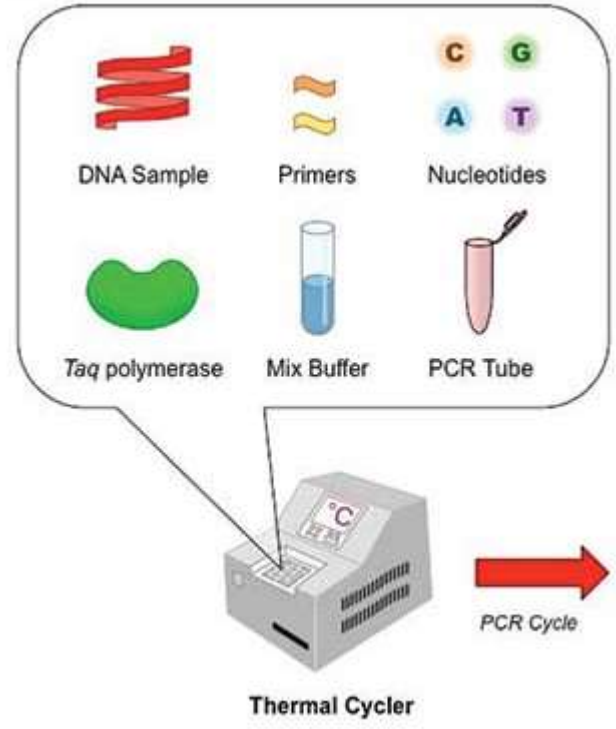
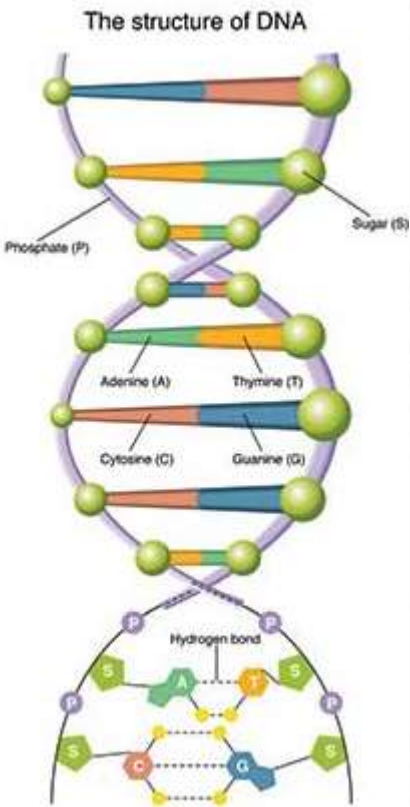
- PCR y casi que solo el PCR tiempo real es el más usado.
- RFLP's
- Secuenciación parcial (Sanger) o genoma completo.

NOTA IMPORTANTE: SOLO LAS USO PARA IDENTIFICAR AL **AGENTE** (Virus, parásito o bacteria) EN EL TEJIDO O "COISA" DESEADA y CONOCER EL DETALLE DEL MISMO.



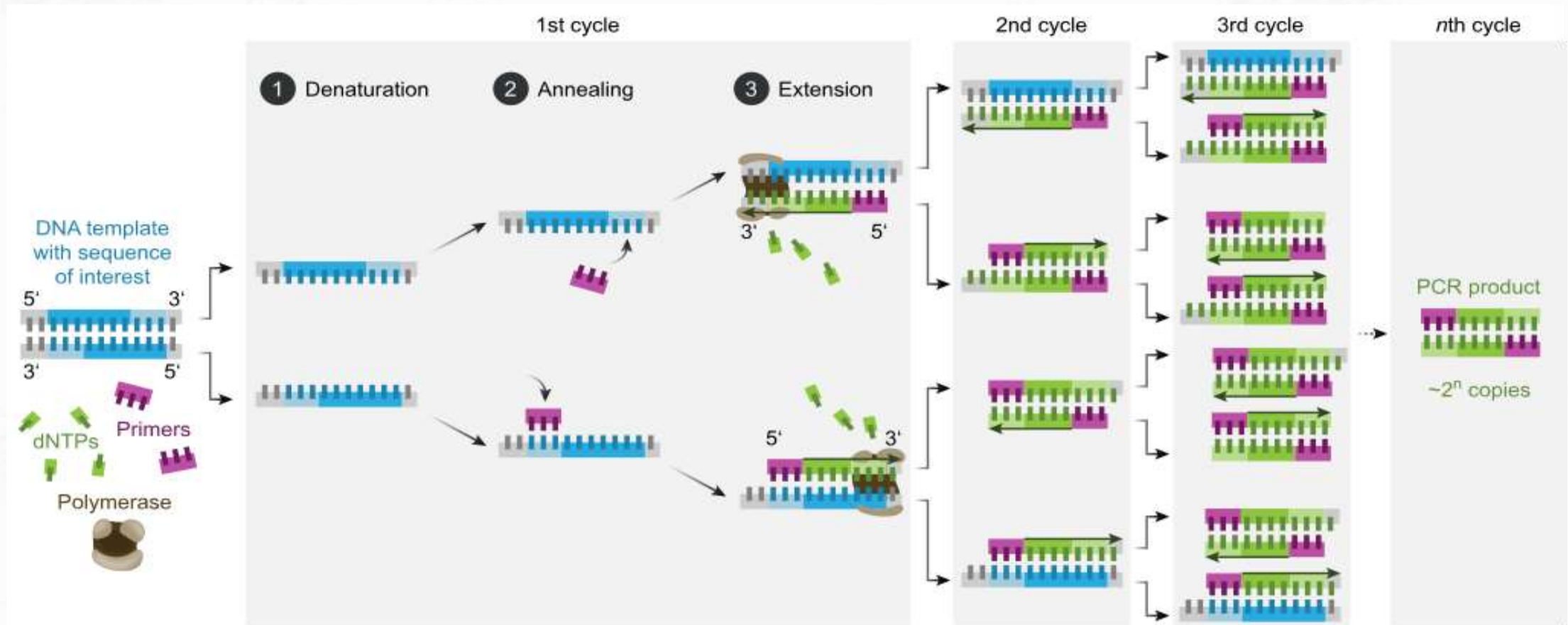
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Prueba que amplifica una sección del ADN en millones de copias



Lowé JL. Diagnostic Applications of Polymerase Chain Reaction (PCR) Technology: A Practice Perspective. Swine Information Library. 2004
<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fthebiologynotes.com%2Fpolymerase-chain-reaction-pcr%2F&psig=AOvVaw159HhMHf87Ym8MCnviwWGs&ust=1651201504290000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCOjjlo7jtfCFQAAAAAABAT>

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



Valor CT= Cycle Threshold; entonces entre más bajo el CT más positiva es la muestra (Ct 23 vs Ct38).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



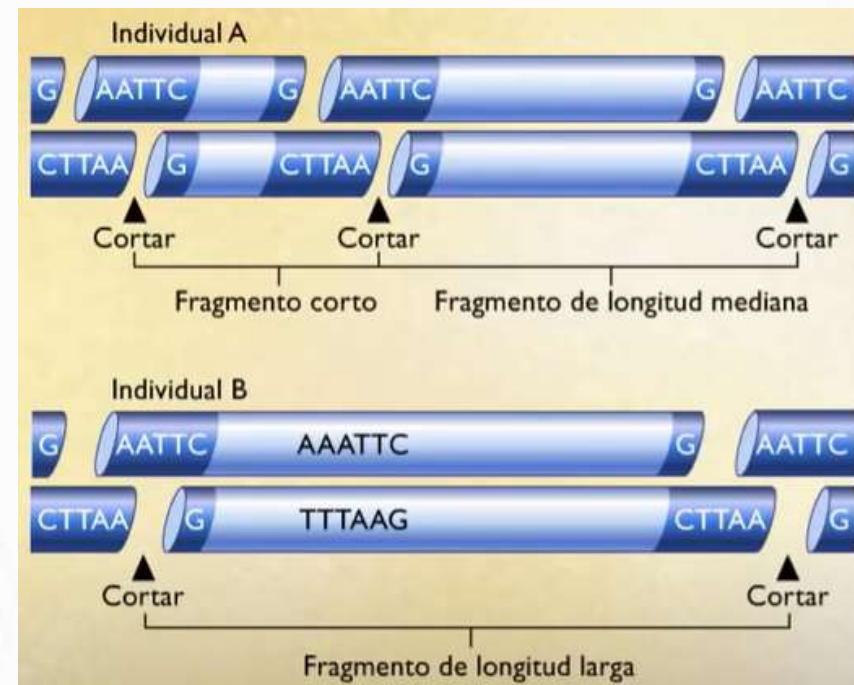
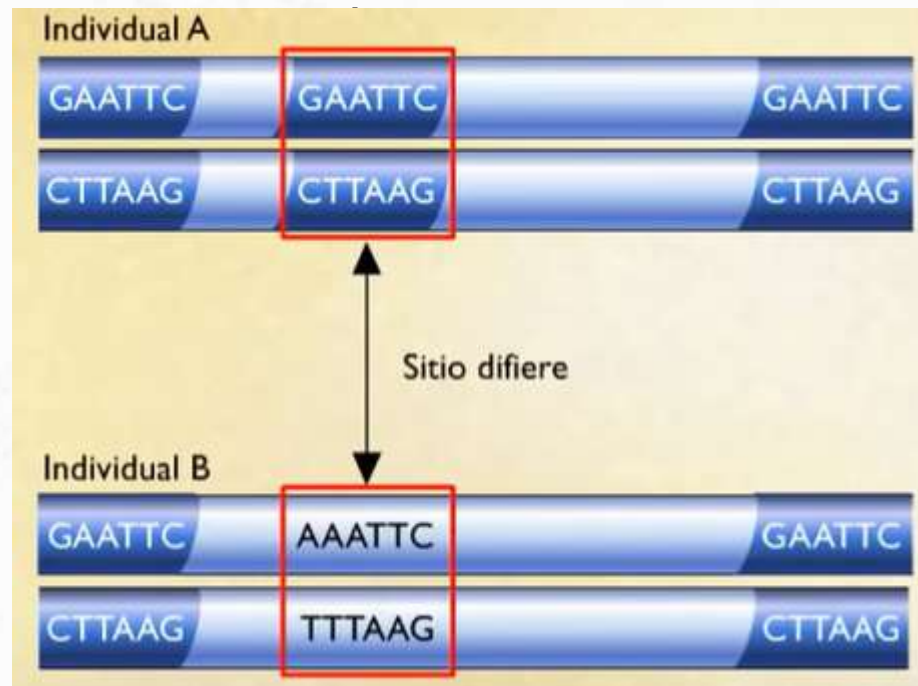
Ventajas	Desventajas
No hay que esperar a que el sistema inmune lo detecte	Solo detecta una porción del genoma
Detección temprana del agente	No significa que el agente detectado sea el causante de la enfermedad
Más rápido que el aislamiento viral o transfección tejido celular (daño citopático)	Se requiere de equipo y personal altamente capacitado.
Protocolos estandarizados	Mayores falsos positivos por arrastre de virus.
Alta especificidad y sensibilidad	



Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP)

Se utilizan enzimas de restricción para cortar secuencias de ADN en sectores conocidos y con diferente longitud

Las enzimas de restricción reconocen secuencias muy específicas de



Se utiliza electroforesis para medir los diferentes tamaño de los segmentos

Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP)



porkaméricas
XX congreso internacional
2022

37 Patrones de Corte/Estado	GTO	JAL	QRO	YUC	SON	VER	PUE	MICH	Prevalencia/RFLP	N° RFLP/Corte
1-1-1	0.74%					0.12%	0.25%		1.09%	9
1-1-2	0.12%								0.12%	1
1-1-3	0.49%	0.12%			0.12%	0.12%			0.85%	7
1-1-4	0.12%								0.12%	1
1-2-1	0.25%	0.62%			0.37%	0.98%	0.25%		2.42%	20
1-2-2		0.25%			1.72%		0.25%		2.17%	18
1-2-3	1.60%	1.85%	0.37%		0.12%	0.25%	0.37%		4.47%	37
1-2-4		0.37%			0.25%	0.12%	0.12%		0.85%	7
1-3-1	0.74%				0.37%				1.09%	9
1-3-2	0.62%	0.25%		0.12%	1.23%		2.09%		4.23%	35
1-3-3	0.37%						0.12%		0.48%	4
1-3-4	0.12%	0.12%					0.49%		0.72%	6
1-4-1	0.25%	0.12%			0.25%				0.60%	5
1-4-2		0.12%			3.81%	1.11%		0.25%	5.19%	43
1-4-3	0.74%	0.12%			0.86%		1.35%		3.02%	25
1-4-4	2.09%	0.86%	0.12%		0.86%		21.26%		25.12%	208
1-5-1							0.25%		0.24%	2
1-5-2		0.25%	0.25%		0.49%	0.49%	0.49%		1.93%	16
1-5-3		1.35%					0.98%		2.29%	19
1-5-4							0.12%	0.12%	0.24%	2
1-6-1	0.12%		0.49%						0.60%	5
1-6-2		1.85%	0.37%			0.25%			2.42%	20
1-6-3	3.32%	0.37%	0.25%	0.12%	0.49%	6.77%	3.81%	0.74%	15.58%	129
1-6-4	0.74%	0.49%				0.25%	1.97%		3.38%	28
1-7-1			0.86%						0.85%	7
1-7-2		0.62%	0.12%						0.72%	6
1-8-2		0.62%				0.12%			0.72%	6
2-1-1					0.12%				0.12%	1
2-1-2					0.12%	0.12%			0.24%	2
2-2-2							0.25%		0.24%	2
2-4-4	0.12%							0.12%	0.24%	2
2-5-2	0.37%	2.09%	0.86%	1.35%	1.85%	1.23%	8.61%		16.06%	133
2-6-2	0.12%								0.12%	1
2-6-4	0.12%								0.12%	1
1-18-2					0.36%				0.36%	3
1-19-1					0.12%				0.12%	1
1-26-2					0.72%		0.12%		0.85%	7
Prevalencia/Estado	12.92%	12.20%	3.62%	1.57%	14.01%	12.80%	41.79%	1.09%	100%	

- Inicialmente servía para clasificar cepas de virus
- Ahora sabemos que pueden haber virus diferentes con nombres iguales.
- MSD= 1-7-4 vs campo
- BIV= 2-5-2 vs campo
- Zoetis= 1-3-2 vs campo

Secuenciación parcial (Sanger)



Conocer como va la secuencia de nucleótidos de cualquier ADN o ARN.

Sequencing and Analysis - PRRSV Type 2 (NA)

Animal ID	Specimen	Target Gene	RFLP	Lineage	Comment
14021, SID #1	Processing Fluid		ORF5	1-3-2	8
<u>Sequence Homology</u>					
Reference Virus	<u>Ingelvac ATP</u>	<u>Lelystad</u>		<u>Prime Pac</u>	
Percent Identity	93.7%	66.1%		93.2%	
Reference Virus	<u>Ingelvac MLV</u>	<u>Fostera</u>		<u>Prevacent</u>	
Percent Identity	91.5%	99.8%		87.1%	

← Este es el linaje

← Este es el RFLP

Nucleotide

```

ATGTTGGGGAAATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCGATTGCTTTCTTTGTGGTGTATCGTGC
CGTTCTGGTTTGCTGTGCTCGGCAACGCCAACAGCAGCAGCAGCTCTCATTTCCAGTTGATTTAT
AACTTGACGCTATGTGAGCTGAATGGCACAGATTGGCTGGCAGAAAAATTTGATTGGGCGGTGGA
GACTTTTGCATCTTTCCCGTGTTGACTCACATTGTTTCTATGGTGCACCTCACCACCAGCCATT
TCCTTGACACAGTTGGTCTGGTACTGTGTCCACCGCCGGGTTTTATCACGGGCGGTATGTCTTG
AGTAGCATCTACGCGGTCTGTGCTCTGGCTGCGTTGATTTGCTTCGTTATTAGGCTTGCGAAGAA
CTGCATGTCCTGGCGCTACTCTTGTACCAGATATACCAACTTCCTTCTGGACACTAAGGGCAGAC
TCTATCGTTGGCGGTCGCCCCGTTATCATAGAAAAAAGGGGTAAGGTTGAGGTCGAAGGTCATCTG
ATCGACCTCAAAGAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGCAACCCCTTTAACCAGAGTTTCAGCGGA
ACAATGGGGTTCGTCTCTAG
    
```

← Esta es la secuencia

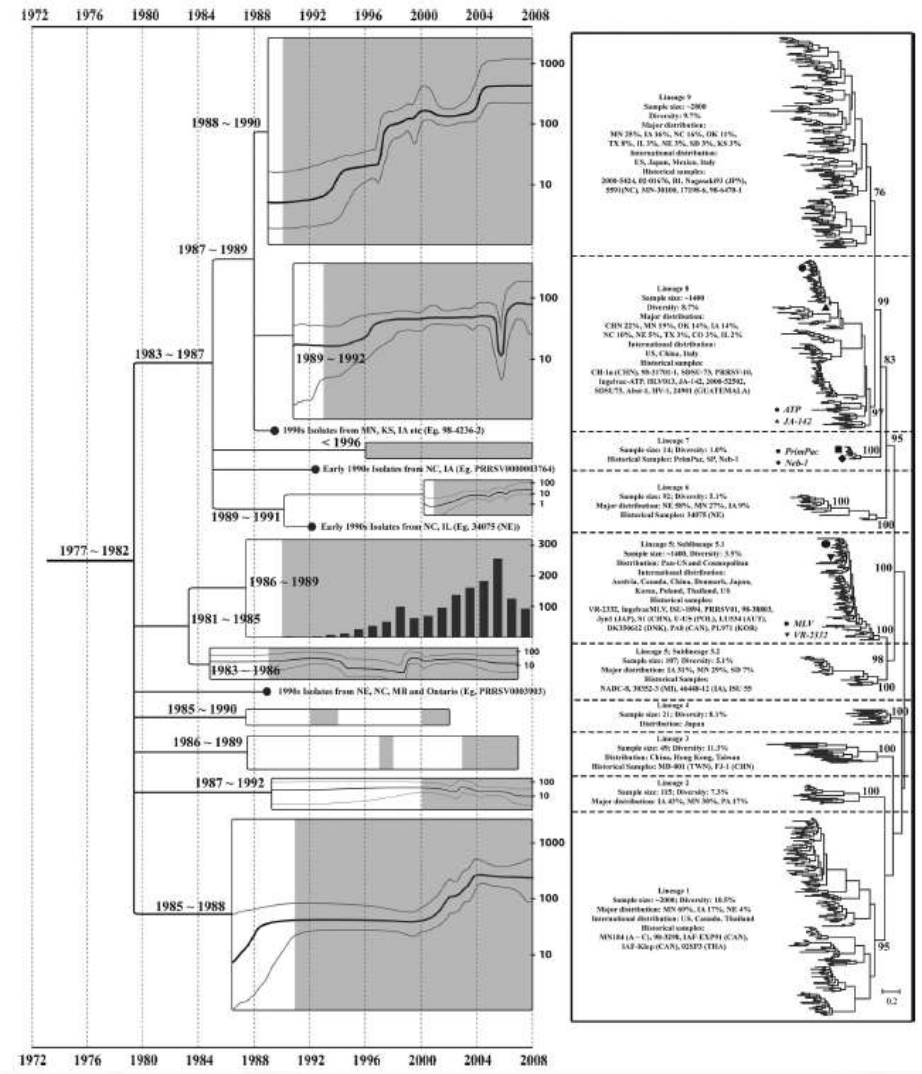
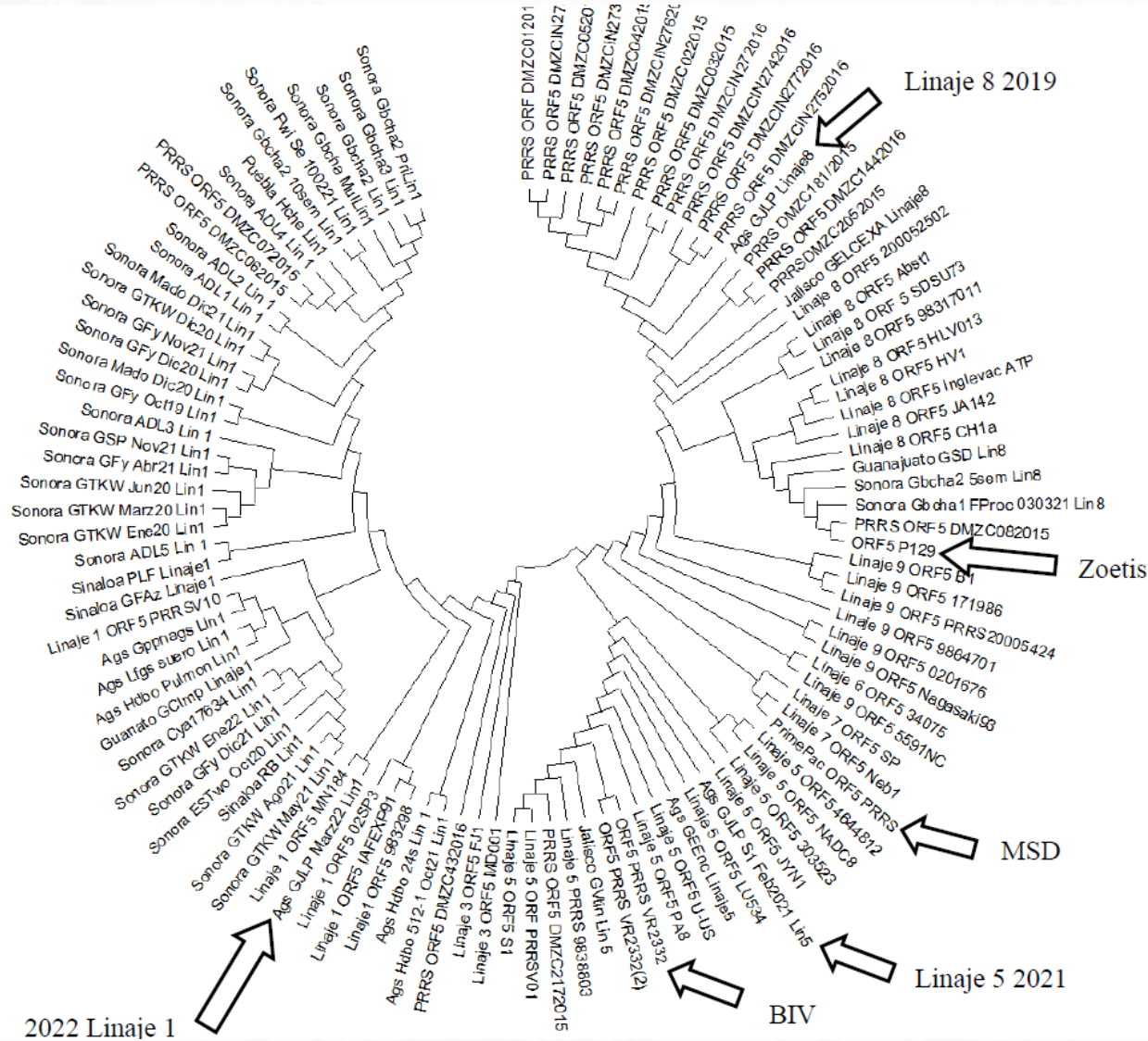
PCR - PRRSV ORF5 Type 2 (NA)

Animal ID	Specimen	Result	Comment
14021, SID #1	Processing Fluid	Positive	

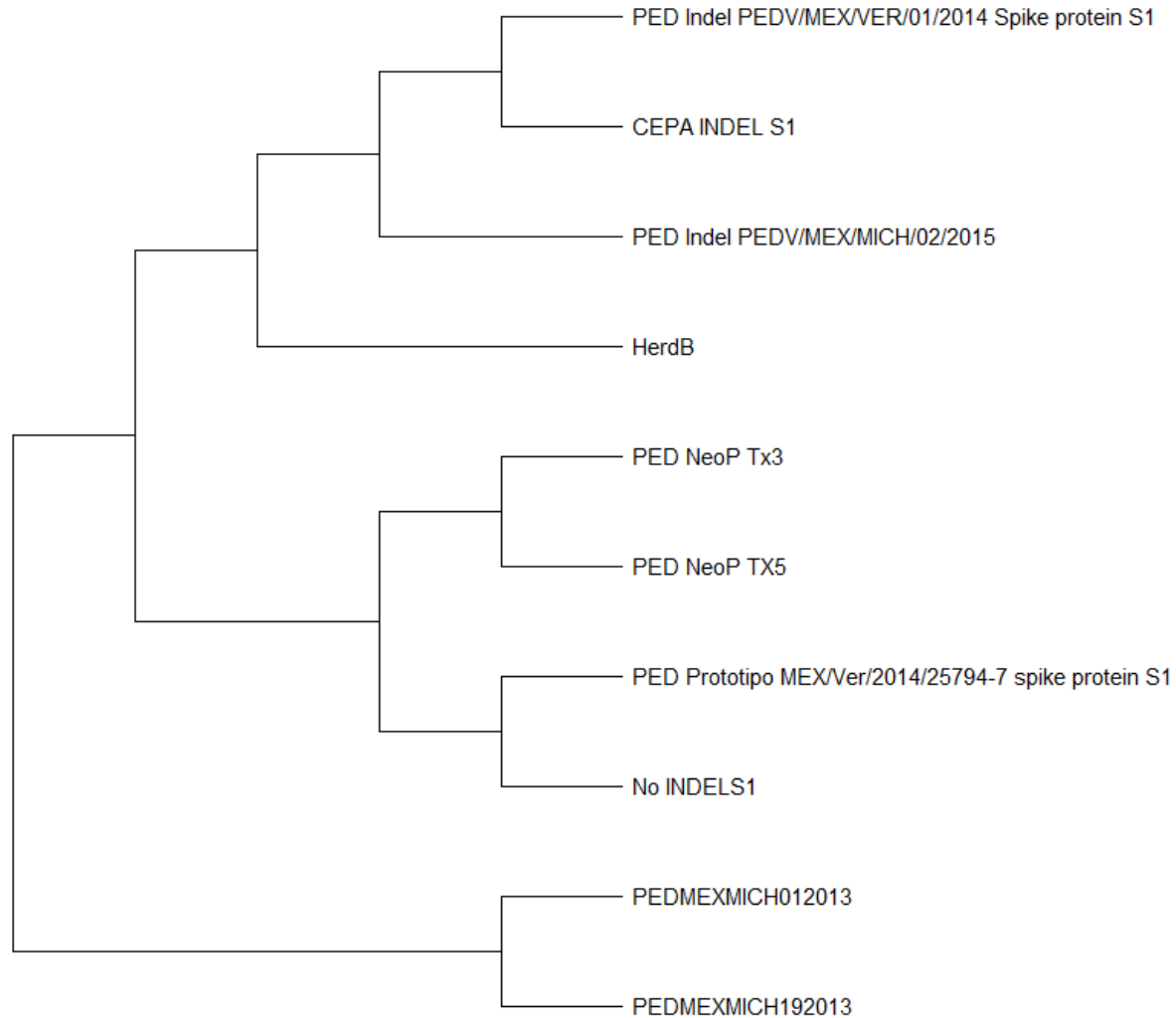


Lo primero es tener un **POSITIVO** por PCR

Secuenciación parcial



Secuenciación parcial



PED prototipo vs PED Indel

Secuenciación parcial (Nota)



porkaméricas
XX congreso internacional
2022

			% DE IDENTIDAD																
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
1.	21-4844	Pool 4 (1-37-2)		84.6	84.1	84.4	61.8	81.6	89.7	83.9	87.7	87.9	91.2	93	90.9	90.9	1.	21-4844	Pool 4 (1-37-2)
2.	Ingelvac/RespPRRS	(2-5-2)	84.6		91.7	91.4	63.1	84.2	85.4	92.7	87.4	87.7	86.4	85.7	85.6	85.2	2.	Ingelvac/RespPRRS	(2-5-2)
3.	MSD PRIME PAC	(1-4-4)	84.1	91.7		92.9	61.8	84.6	85.4	87.7	87.9	87.9	85.4	84.7	85.7	85.1	3.	MSD PRIME PAC	(1-4-4)
4.	ZOETIS Fosterá PRRS	(1-3-2)	84.4	91.4	92.9		63.8	87.1	85.9	87.4	87.1	87.2	84.9	85.2	85.4	84.4	4.	ZOETIS Fosterá PRRS	(1-3-2)
5.	LELYSTAD		63.2	64.5	63.2	65.5		62.7	61.2	59.2	61	60.8	60.8	60	62.5	61.2	5.	LELYSTAD	
6.	A (1-3-3)		81.6	84.2	84.6	87.1	64		82.4	81.4	84.2	83.7	83.1	82.4	83.1	82.6	6.	A (1-3-3)	
7.	B (1-13-2)		89.7	85.4	85.4	85.9	62.7	82.4		84.1	88.4	88.6	92	90.5	90.5	94	7.	B (1-13-2)	
8.	C (1-5-2)		90.2	99.2	94	93.7	65.5	87.2	90.2		85.6	85.7	85.4	85.2	85.1	83.9	8.	C (1-5-2)	
9.	D (1-7-3)		87.9	87.6	88.1	87.2	62.5	84.4	88.6	91.9		98.5	88.7	89.4	88.2	90.4	9.	D (1-7-3)	
10.	E (1-7-4)		87.9	87.7	87.9	87.2	62.2	83.7	88.6	92	98.7		88.9	88.7	88.4	90.4	10.	E (1-7-4)	
11.	F (1-19-1)		91.2	86.4	85.4	84.9	62.2	83.1	92	91.9	88.9	88.9		93.2	93	93.4	11.	F (1-19-1)	
12.	G (1-26-1)		93	85.7	84.7	85.2	61.2	82.4	90.5	91.4	89.6	88.7	93.2		92.4	92.9	12.	G (1-26-1)	
13.	H (1-26-2)		90.9	85.6	85.7	85.4	64	83.1	90.5	91.5	88.4	88.4	93	92.4		91.9	13.	H (1-26-2)	
14.	I (1-18-2)		90.9	85.2	85.1	84.4	62.7	82.6	94	90.4	90.5	90.4	93.4	92.9	91.9		14.	I (1-18-2)	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			

Ningún % de similitud está relacionado con la protección de una vacuna.

Pongamos la biología a trabajar



porkaméricas
XX congreso internacional
2022

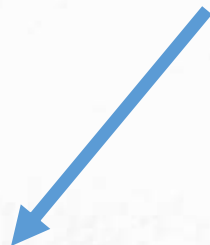


Al integrar todos los datos clínicos, productivos y de necropsia

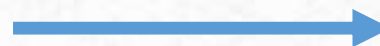


Diagnostico presuntivo y de laboratorio

¿Queremos identificar el agente?



PCR



Secuenciación

Adicionalmente nos sirve:



porkaméricas
XX congreso internacional
2022

- Caracterización de los diferentes aislados.
- Diferenciación entre cepas de virus y (entre) bacterias o incluso (entre) parásitos.
- Hacer un historial de cepas.
- Conocer la presencia de virus y sus cambios en un cluster o región determinada.
- Saber como va evolucionando el virus aunque no esté en un cluster.
- Otras aplicaciones (herencia, evolución, etc.) no relevantes para tomar decisiones en las granjas.



porkaméricas
XX congreso internacional
2022

GRACIAS





porkaméricas

XX congreso internacional
2022



Asociación
porkcolombia
FONDO NACIONAL DE LA PORCICULTURA



ceniporcino
Centro de investigación y transferencia
de tecnología del sector porcícola

