ASPECTOS PRÁCTICOS DE LA PCR Y SECUENCIACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE PATOLOGÍAS AVIARES

Roser Dolz Pascual

WPSA, Valencia, 2014

CReSA
Centre de Recerca en Sanitat Animal

PH Ibérica
Albio Ferm

TOMA DE MUESTRAS

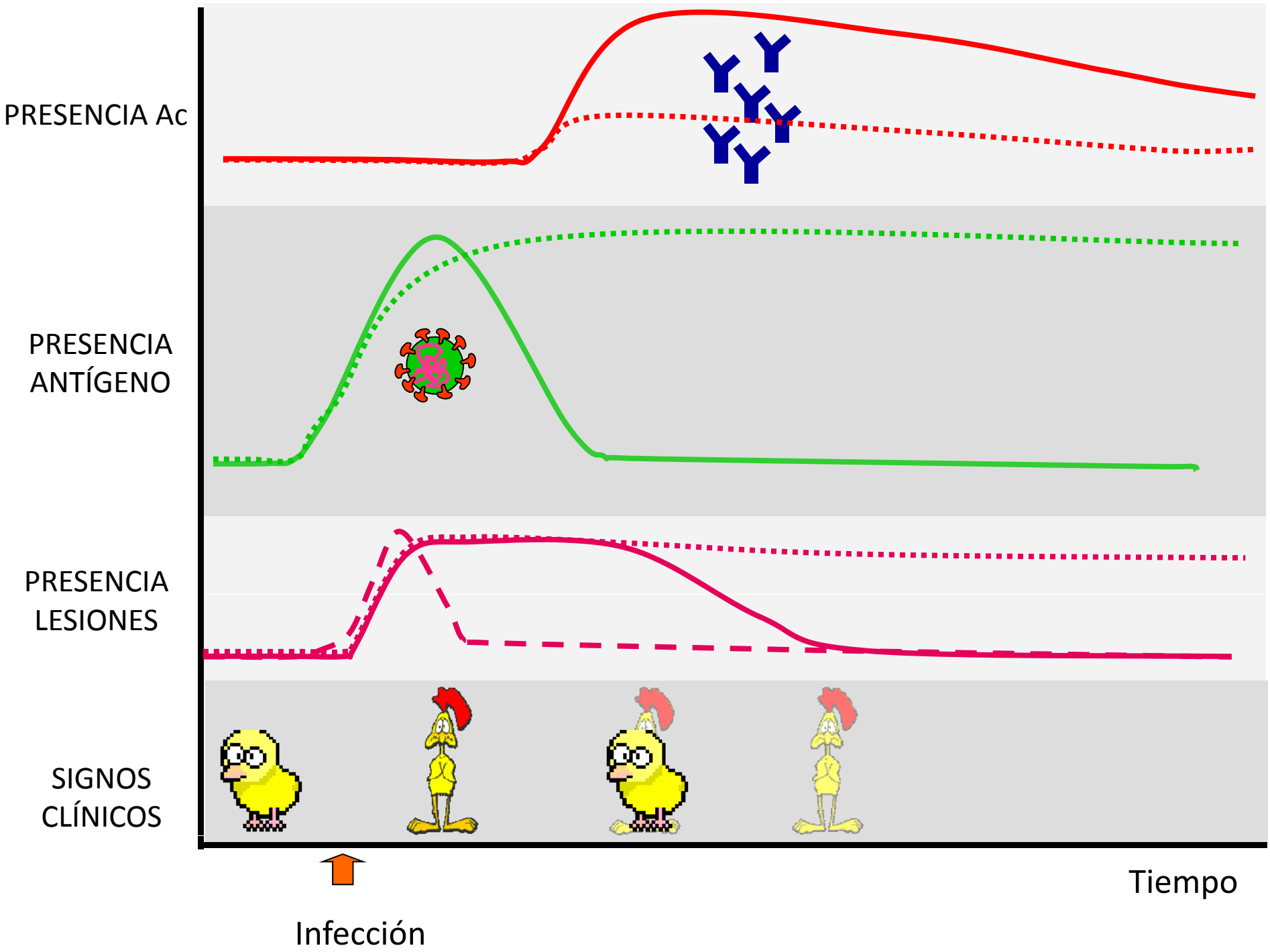
- ÓRGANOS
- TIPO DE MUESTRA
- MÉTODO CONSERVACIÓN

TIPO ESTUDIO LABORATORIAL

- HISTOPATOLÓGICO
- MICROBIOLÓGICO
- SEROLÓGICO
- MOLECULAR
- PARASITOLÓGICO

PATOLOGÍA QUE SE SOSPECHA

- ETIOLOGÍA
- PATOGENIA


PRESENCIA Ac
PRESENCIA ANTÍGENO
PRESENCIA LESIONES
SIGNOS CLÍNICOS
Tiempo
Infección

PATOLOGÍA RESPIRATORIA

PROCESOS ETIOLOGÍA COMPLEJA

BACTERIANOS

- Mycoplasma gallisepticum
- E. coli
- ORT

VÍRICOS

- Bronquitis infecciosa
- TRT
- ILT

- Prácticamente todos ellos son patógenos primarios endémicos en el campo.
- La presencia de uno de estos agentes favorece la coinfección con el resto, la cual cosa agrava los signos clínicos.
- Los signos clínicos son poco específicos para cada uno de los agentes

BRONQUITIS INFECCIOSA (IBV)

- Diseminación rápida.
- Existen diversos serotipos de IBV
- Es necesario determinar el serotipo involucrado en el brote para diseñar planes vacunales óptimos.

DIAGNÓSTICO

Aislamiento y serotipado

- Lento y caro

Detección RT-PCR

- Tipificación virus secuenciación

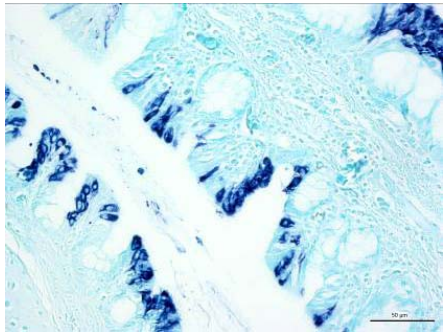
Serología

- Interpretación compleja - seroconversión

BRONQUITIS INFECCIOSA

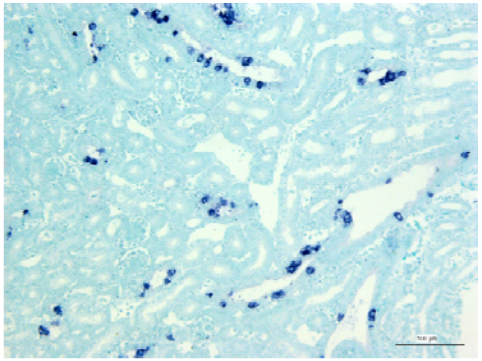
AEROSOL

REPLICACIÓN 1ª
Epitelio respiratorio
24h→6-8dpi

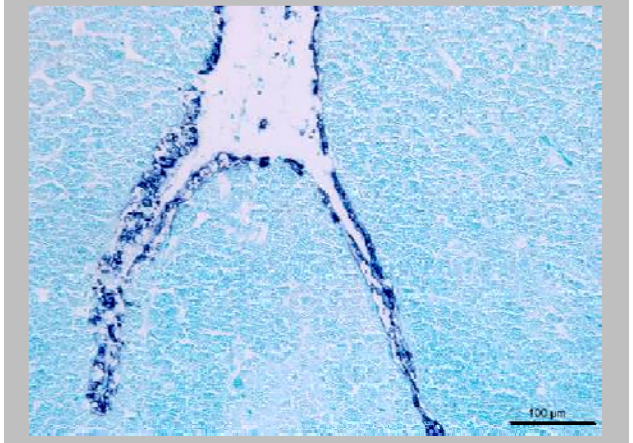


REPLICACIÓN 2ª

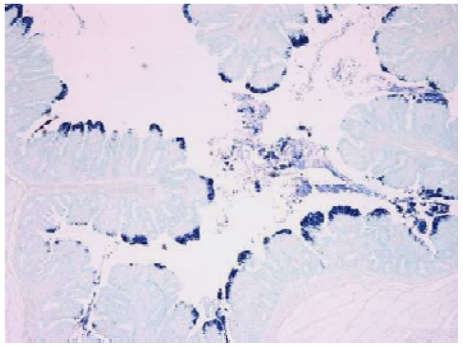
Epitelio tubular renal
(4dpi→13dpi)

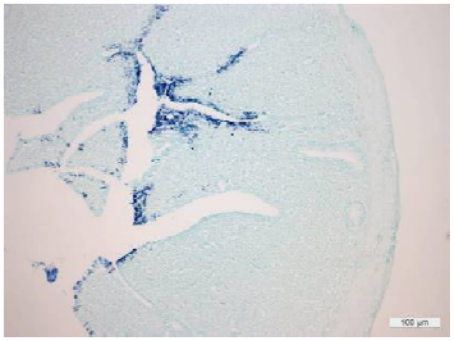


Epitelio reproductor
(6dpi→9dpi)



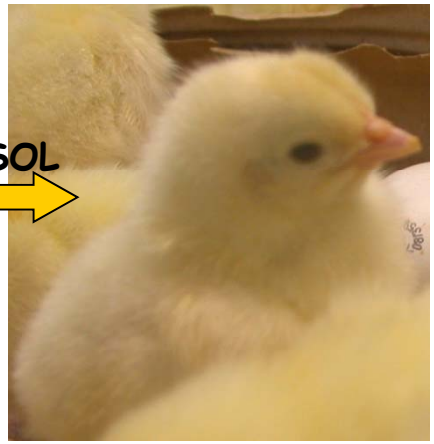
Epitelio intestinal
(2dpi→21dpi)





BRONQUITIS INFECCIOSA

AEROSOL



REPLICACIÓN 1ª
Epitelio respiratorio

REPLICACIÓN 2ª
Epitelio reproductor

DAÑO
PERSISTENTE
INAPARENTE

Falsas ponedoras

Aves puesta intraabdominal

BRONQUITIS INFECCIOSA

MUESTREO

Fase aguda (signos clínicos o infección reciente)

- Tráquea (siempre)
- Tonsila cecal o hisopo cloacal
- Riñones si hay signos clínicos o lesiones de enfermedad renal

Fase crónica

- Tonsila cecal

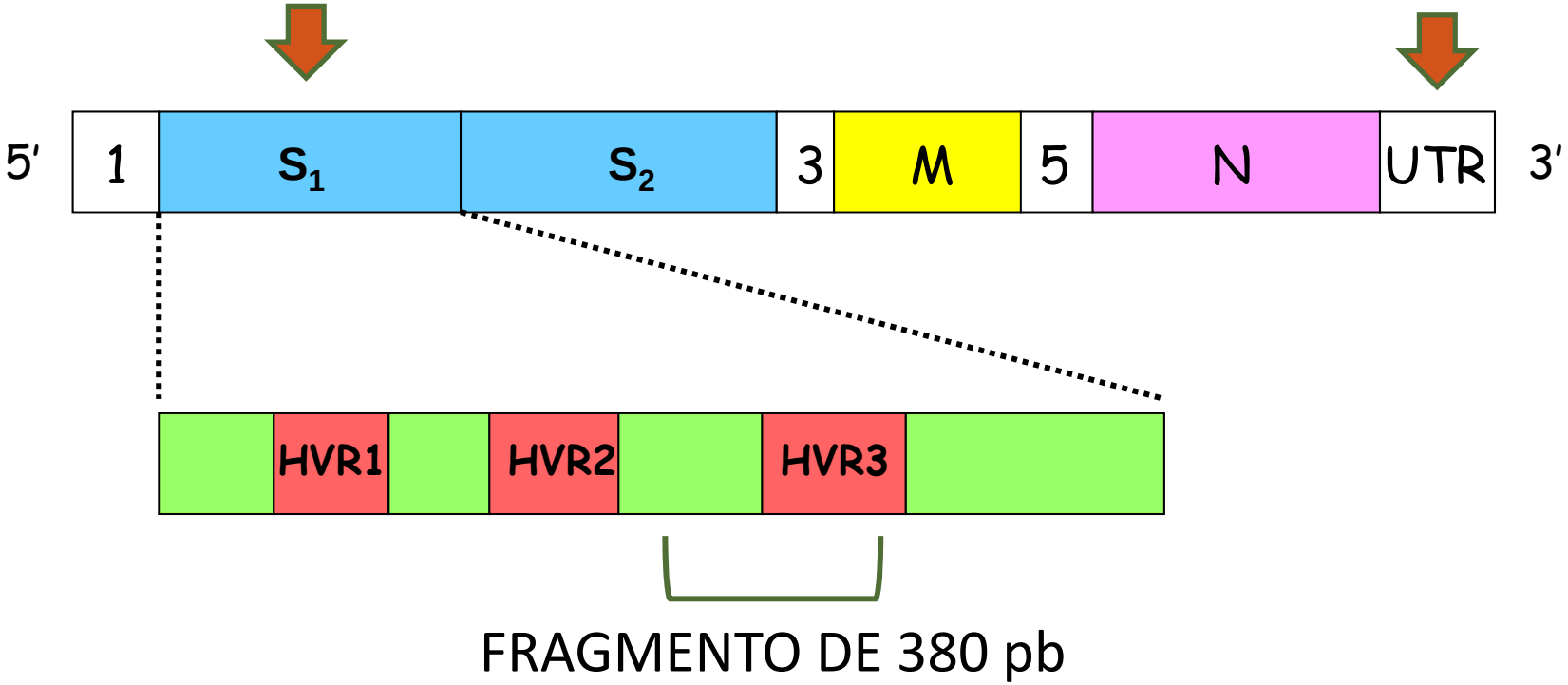
FALSAS PONEDORAS → INFECCIÓN TEMPRANA

En fase de recría, descartar en cualquier proceso respiratorio que IBV esté involucrado

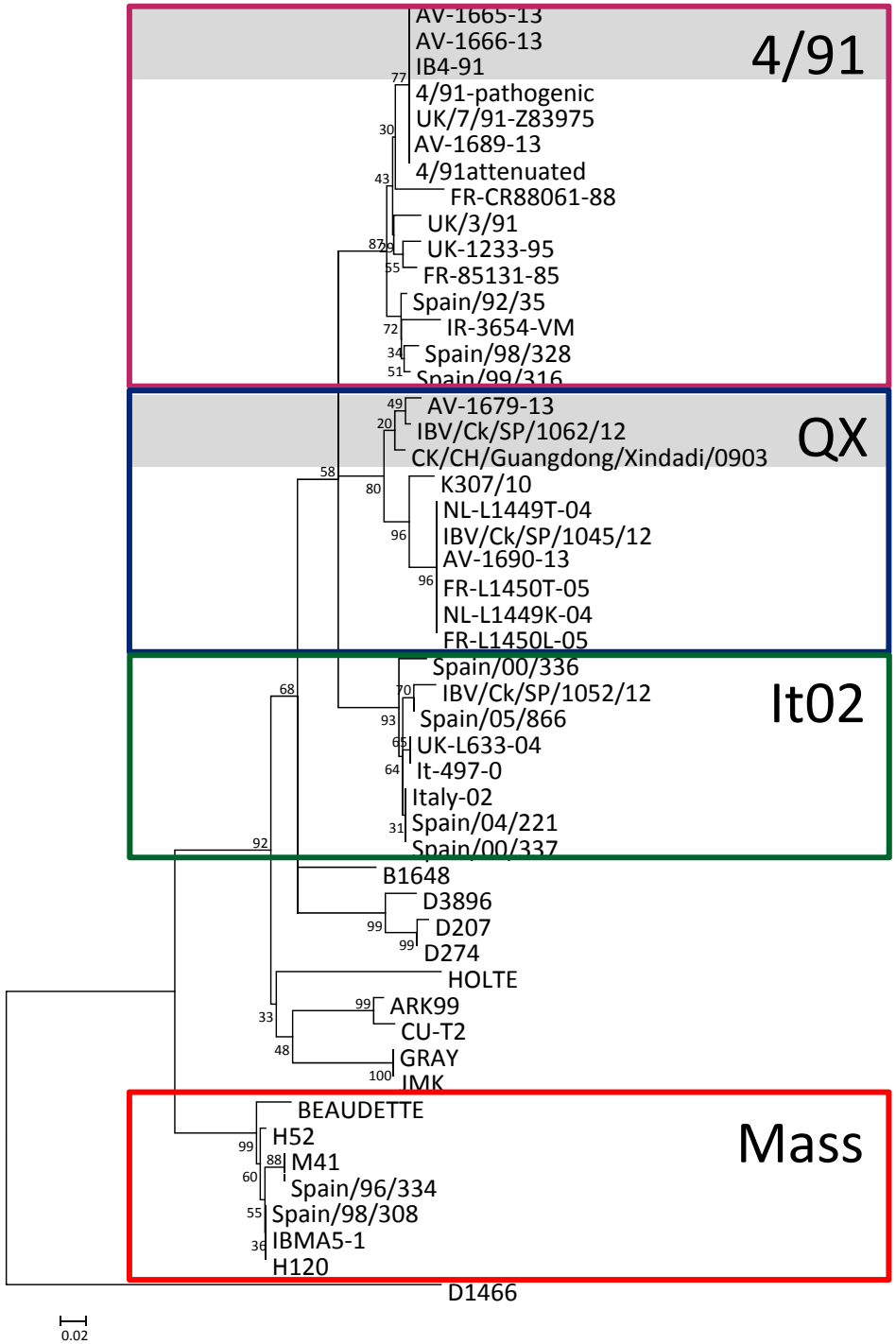
IBV. GENOTIPADO

PCR GENOTIPADO

PCR DIAGNÓSTICO (+/-)

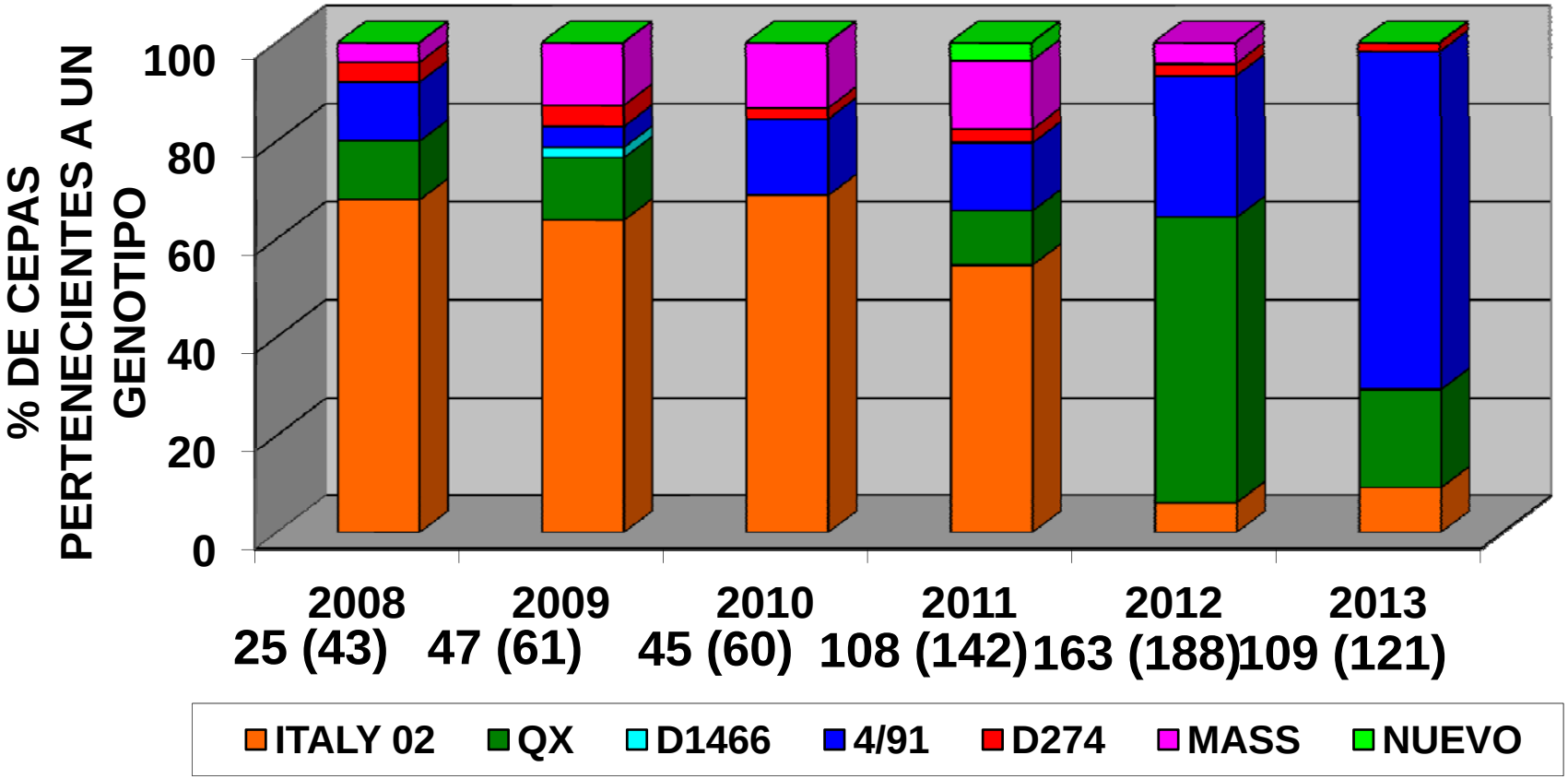


No secuenciable significa que no se ha podido amplificar un fragmento que permita secuenciar y clasificar el virus


4/91
AV-1665-13
AV-1666-13
IB4-91
4/91-pathogenic
UK/7/91-Z83975
AV-1689-13
4/91attenuated
FR-CR88061-88
UK/3/91
UK-1233-95
FR-85131-85
Spain/92/35
IR-3654-VM
Spain/98/328
Spain/99/316
QX
AV-1679-13
IBV/Ck/SP/1062/12
CK/CH/Guangdong/Xindadi/0903
K307/10
NL-L1449T-04
IBV/Ck/SP/1045/12
AV-1690-13
FR-L1450T-05
NL-L1449K-04
FR-L1450L-05
It02
Spain/00/336
IBV/Ck/SP/1052/12
Spain/05/866
UK-L633-04
It-497-0
Italy-02
Spain/04/221
Spain/00/337
B1648
D3896
D207
D274
HOLTE
ARK99
CU-T2
GRAY
IMK
Mass
BEAUDETTE
H52
M41
Spain/96/334
Spain/98/308
IBMA5-1
H120
D1466
0.02

BRONQUITIS INFECCIOSA

DINÁMICA Y CAMBIANTE



MYCOPLASMA

- Replicación primaria en tráquea
- Infección crónica
- Diseminación relativamente lenta. Se acelera con la coinfección con otros agentes.
- Favorece el resto de infecciones respiratorias.
- Existe transmisión vertical, pero en un porcentaje bajo de animales

DIAGNÓSTICO

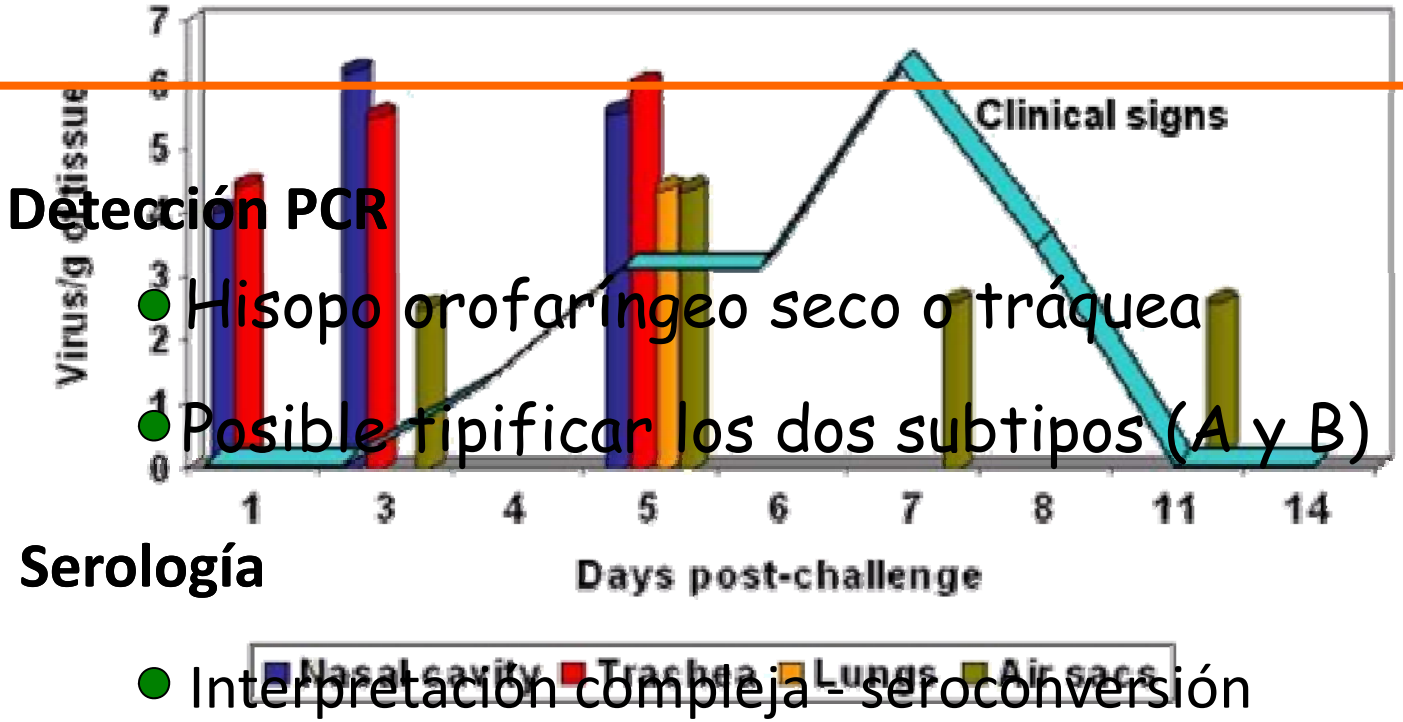
MUESTREOS AMPLIOS Y TARDÍOS

- Detección PCR (tráquea, hisopo traqueal)-10
- Serología (30)

aMPV (TRT, SHS)

- Existen 4 subtipos descritos del virus, pero hasta el momento se han confirmado dos a nivel de campo en España.

- El virus permanece durante un espacio relativamente corto de tiempo en el animal



Detección PCR

- Hisopo orofaríngeo seco o tráquea
- Posible tipificar los dos subtipos (A y B)

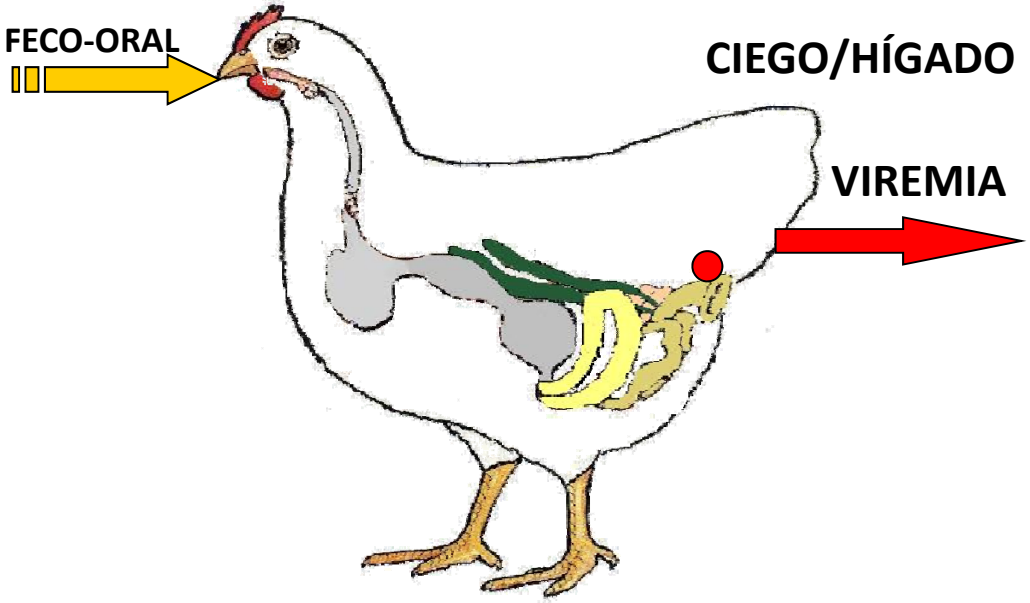
Serología

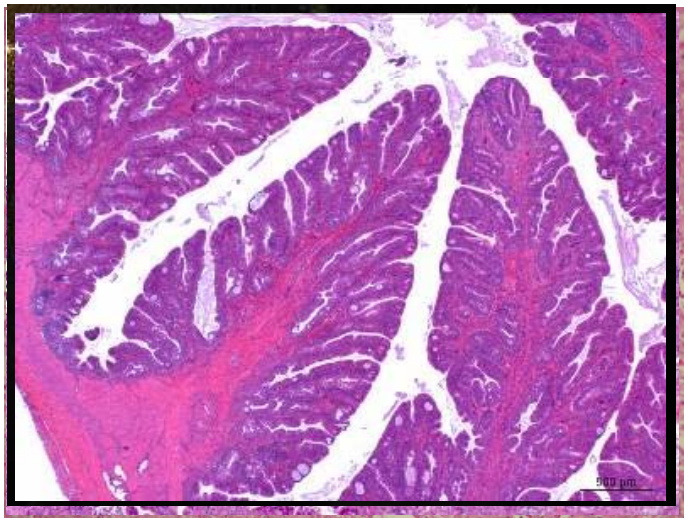
- Interpretación compleja - seroconversión

GUMBORO (IBDV)

BOLSA FABRICIO

REPLICACIÓN 1ª
12hrs-6dpi





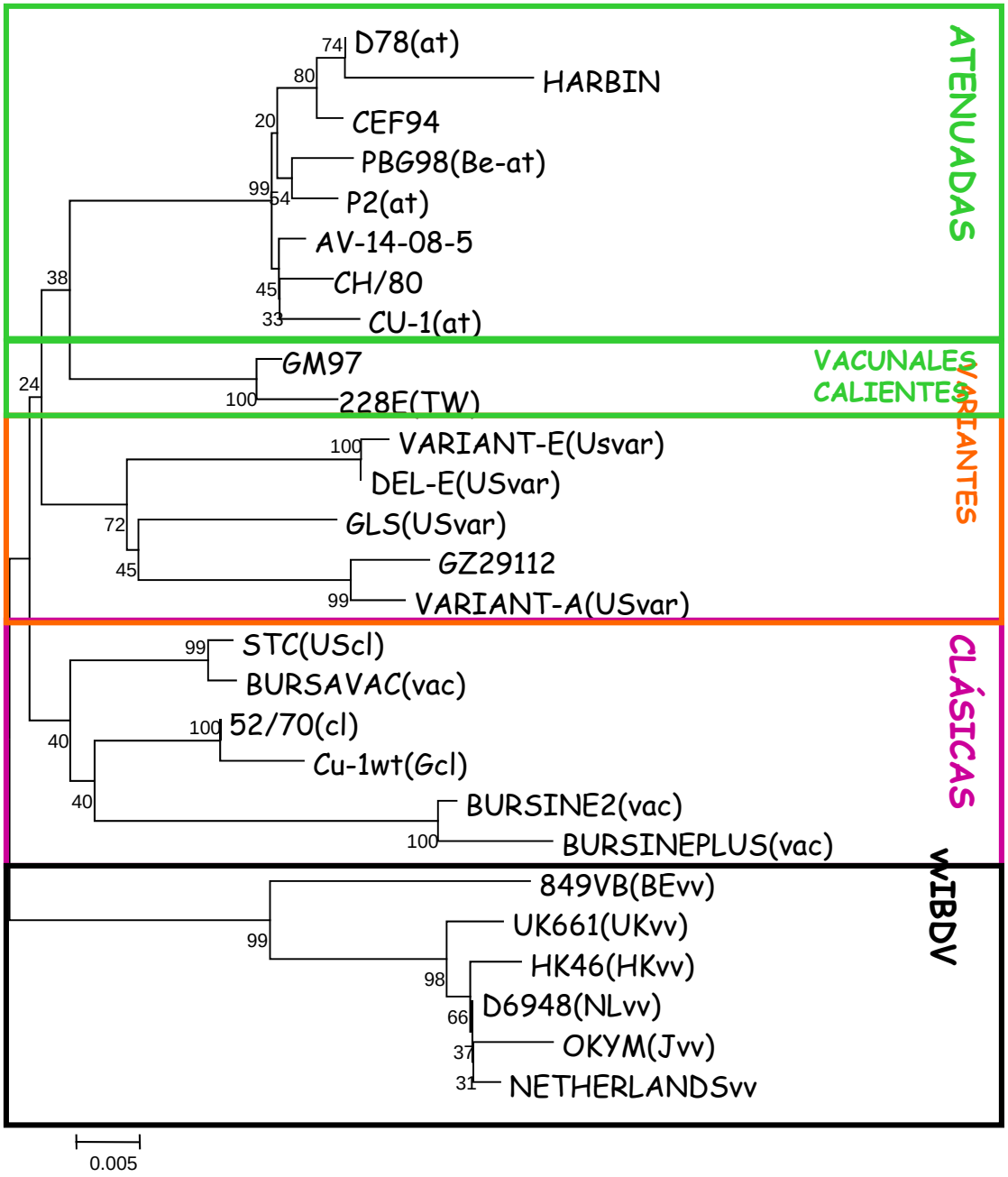
REPLICACIÓN 2ª (12hrs-7dpi)

TIMO
BAZO
TONSILA CECAL
MÉDULA ÓSEA

GUMBORO (IBDV)

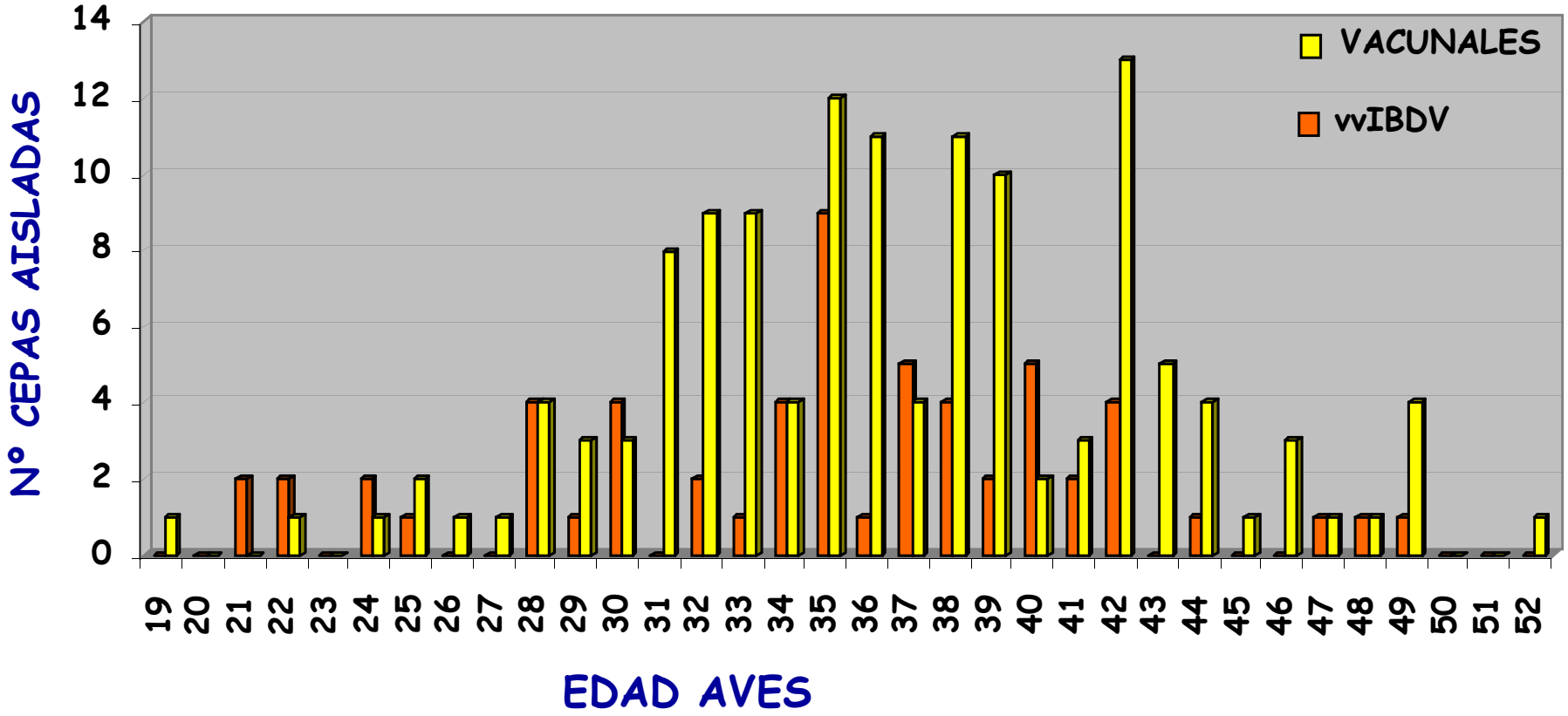
DIAGNÓSTICO

- **IBDV** ➡ **RT-PCR Y SECUENCIACIÓN**
  - ➡ Bolsa de Fabricio
- ➡ **HISTOPATOLOGÍA**
  - ➡ Bolsa de Fabricio (formol)


ATENUADAS
D78(at)
HARBIN
CEF94
PBG98(Be-at)
P2(at)
AV-14-08-5
CH/80
CU-1(at)
VACUNALES CALIENTES
GM97
228E(TW)
VARIANTES
VARIANT-E(Usvar)
DEL-E(USvar)
GLS(USvar)
GZ29112
VARIANT-A(USvar)
CLÁSICAS
STC(UScl)
BURSAVAC(vac)
52/70(cl)
Cu-1wt(Gcl)
BURSINE2(vac)
BURSINEPLUS(vac)
vIBDV
849VB(BEvv)
UK661(UKvv)
HK46(HKvv)
D6948(NLvv)
OKYM(Jvv)
NETHERLANDSvv
0.005

GUMBORO (IBDV)

DETECCIÓN DE CEPAS vvIBDV Y VACUNALES SEGÚN EDAD DE LAS AVES



Depende de la vacunación

>5 días tras la vacunación

25-35 días

GUMBORO (IBDV)

MONITORIZACIÓN VACUNACIÓN

DIAGNÓSTICO

RT-PCR Y SECUENCIACIÓN

- Bolsa de Fabricio (5-10)

¿A qué edad?

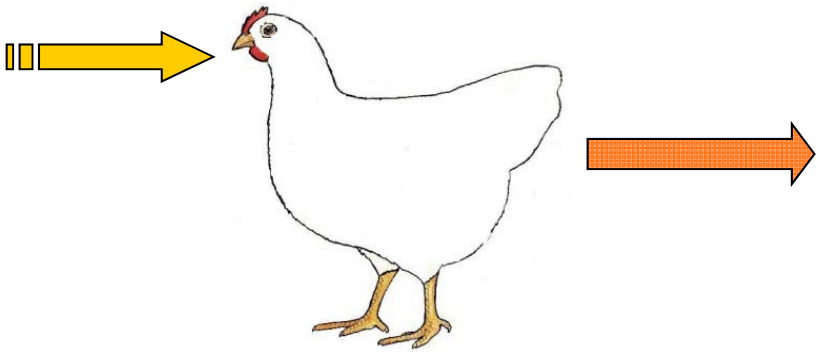
Depende de la vacunación

>5 días tras la vacunación

25-35 días

ADENOVIRUS (FAdV)

HORIZONTAL
(SECRECIONES/HECES)



REPLICACIÓN PRIMARIA

- Tracto gastrointestinal
- Tracto respiratorio superior (mucosa nasal y traqueal)

VIREMIA

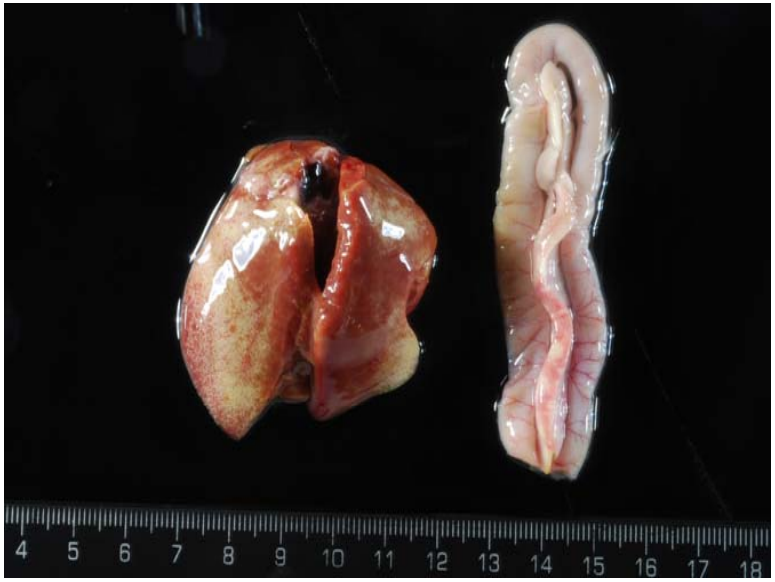
REPLICACIÓN EN HÍGADO (HEPATOCITOS), PÁNCREAS

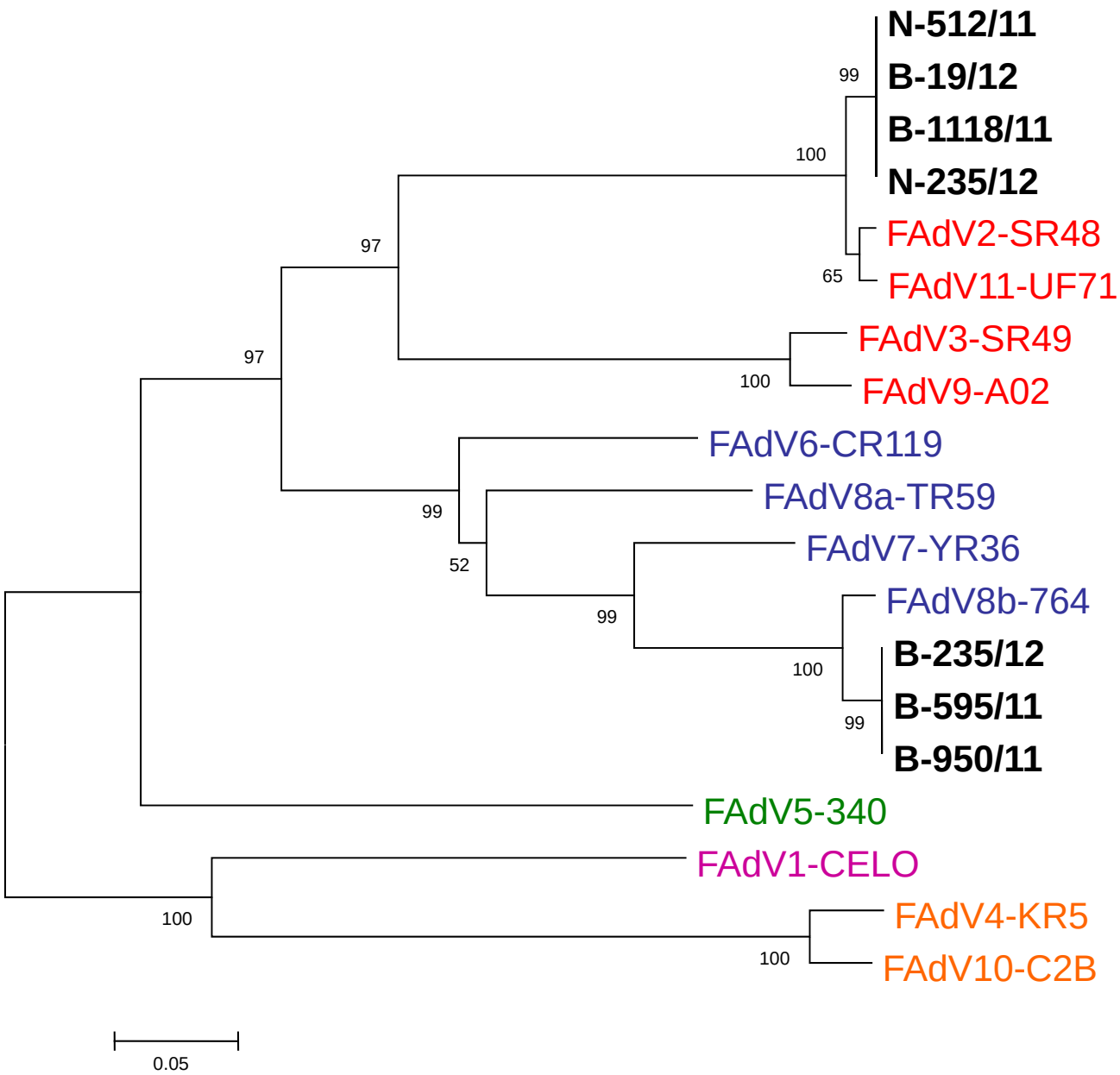
DIAGNÓSTICO

Hígado

- Confirmar FAdV
- Determinar serotipo

Poco útiles en cuanto a determinar excreción y transmisión




N-512/11
B-19/12
B-1118/11
N-235/12
FAdV2-SR48
FAdV11-UF71
FAdV3-SR49
FAdV9-A02
FAdV6-CR119
FAdV8a-TR59
FAdV7-YR36
FAdV8b-764
B-235/12
B-595/11
B-950/11
FAdV5-340
FAdV1-CELO
FAdV4-KR5
FAdV10-C2B
99
100
97
65
97
100
99
52
99
100
99
100
100
0.05

OTRAS INFECCIONES

	TEJIDO ELECCIÓN	OBSERVACIONES
VIRUS DE MAREK	Pulpa de pluma	Presencia de virus vacunal
CAV	Timo, médula ósea	Infección común
ILTV	Hisopo traqueal, tráquea	Clasificación compleja
NDV	Hisopo traqueal, cloacal	Clasificación virulencia Epidemiología
IA	Hisopo traqueal, cloacal Pulpa de pluma viremia	Clasificación virulencia Epidemiología