

MUESTREO Y ENVÍO DE MUESTRAS. REQUISITOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA PPA.

Seminario “Acciones de emergencia ante la confirmación de Peste Porcina
Africana “
23 de marzo de 2022

Raquel Nieto Martínez, INIA-CISA/CSIC

Muestreo y envío de muestras



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



**GOBIERNO
DE ESPAÑA**

**MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN**



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



INIA
Centro Nacional Instituto de Investigaciones
y Tecnología Agraria y Alimentaria

SISTEMA de Vigilancia sanitaria

El objetivo: proporcionar información rápida y fiable que posibilite acciones destinadas a la prevención y control de las enfermedades

Componente esencial en un sistema de vigilancia



Laboratorios oficiales de diagnóstico



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Centro Nacional Instituto de Investigaciones
y Tecnología Agraria y Alimentaria

Laboratorios oficiales de diagnóstico

ENTIDADES dentro de la estructura sanitaria y de vigilancia NACIONAL E INTERNACIONAL

- Esenciales para la confirmación de la situación sanitaria de los animales y la identificación de patógenos.
- Permiten la detección precoz de enfermedades animales.

**UN DIAGNÓSTICO RÁPIDO Y FIABLE
ES INDISPENSABLE EN LA PREVENCIÓN y
CONTROL DE ENFERMEDADES**

OBJETIVOS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

- Documentar la **ausencia de una determinada enfermedad** en un país o región determinado,
- **evitar su propagación** a través del comercio,
- **confirmar** el diagnóstico de los casos clínicos,
- **identificar a los animales infectados** para implementar medidas de control,
- estimar la **prevalencia** de una infección para facilitar el análisis del riesgo,
- **erradicar** una infección de una zona o país,
- **clasificar** los animales según su salud o estado inmunitario tras la vacunación
- Herramienta para **seguir la evolución de una enfermedad**, facilitar la lucha contra enfermedades.

El punto de partida para la investigación de una enfermedad **en el laboratorio** es la recogida de **muestras**.

DETECCIÓN Ac



- SUERO (ELISA, IPT)
- SANGRE (EDTA)
- EXUDADOS
- HOMOGENIZADOS TEJIDOS DIANA (bazo, riñón, pulmón, ganglios linfáticos, MÉDULA ÓSEA)

DETECCIÓN DE VIRUS



- SUERO
- SANGRE (EDTA)
- HOMOGENIZADOS TEJIDOS DIANA (bazo, riñón, pulmón, ganglios linfáticos, MÉDULA ÓSEA)

UN BUEN DIAGNÓSTICO NECESITA UNA BUENA MUESTRA



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Centro Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

PLAN DE MUESTREO ADECUADO

MUESTRA

- APROPIADA
- DE CALIDAD
- REPRESENTATIVA
- VOLUMEN o CANTIDAD SUFICIENTE

PLAN DE MUESTREO ADECUADO

- EMBALAJE Y TRANSPORTE
- IDENTIFICACION DE LAS MUESTRAS
- TIEMPO DE RECEPCIÓN EN LABORATORIO
- ALMACENAMIENTO

PLAN DE MUESTREO ADECUADO

○ MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

- EN LA OBTENCION DE MUESTRAS
- EN TRABAJO DE LABORATORIO
- EN EL ARCHIVO Y ELIMINACION DE MUESTRAS



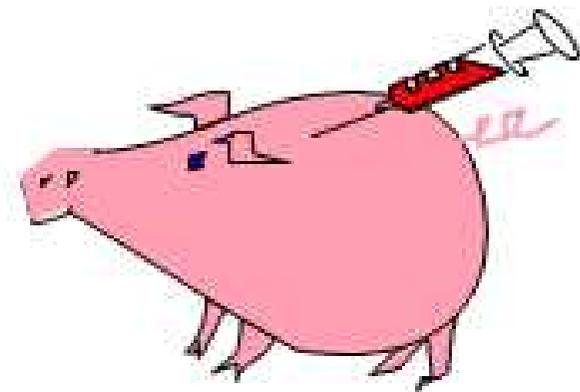
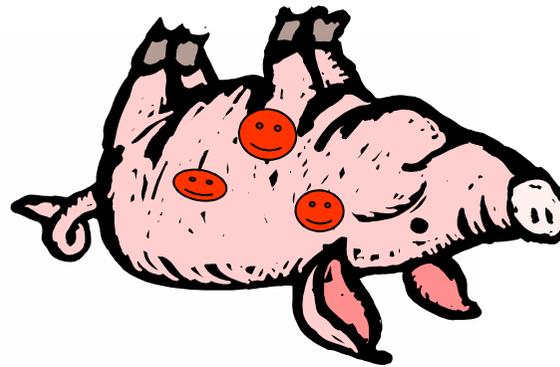
MATERIAL NECESARIO PARA RECOGIDA MUESTRAS

Material necesario para la recogida de muestras.

- **Envases con tapas herméticas, preferiblemente de plástico** para recoger las muestras de órganos
- **Tubos estériles sin anticoagulante** para recoger sangre y obtener suero.
- **Tubos estériles con anticoagulante (EDTA)** para recoger sangre completa.
- **Jeringuillas y agujas apropiadas.**
- **Cuchillo, bisturí, pinzas y tijeras**
- **Cajas con refrigerantes y cajas para aislamiento térmico.**
- **Hielo seco (si es necesaria la congelación de las muestras)**
- **Etiquetas y rotuladores resistentes al agua.**

Todas las muestras se deben identificar de forma individual

MUESTRAS DE ELECCIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PPA



Suero: sangre completa empleando tubos estériles sin anticoagulante.
Dejar que se forme el **COÁGULO**.

LA HEMÓLISIS EN LA MUESTRA DE SUERO AFECTA NEGATIVAMENTE A LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS.

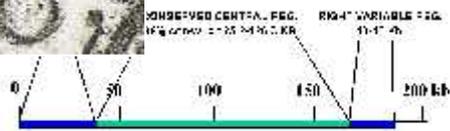
Sangre: sangre completa empleando tubos estériles con anticoagulante
(EDTA: EVITAR USO HEPARINA)

Órganos: sin formalina

- Bazo
- Pulmón
- Riñón
- Amígdalas
- Corazón
- Ganglios linfáticos: mesentéricos, retrofaríngeos, renal, gastrohepático etc.

Médula ósea de hueso largo o esternón

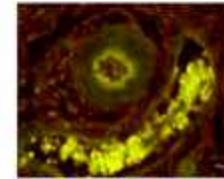
Detección del Virus



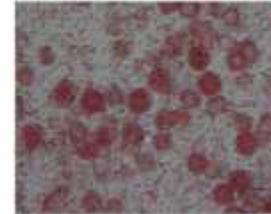
(A) DETECCIÓN DEL **GENOMA VIRAL** MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (**PCR**)

(B) DETECCIÓN DEL **ANTÍGENO VIRAL** MEDIANTE TÉCNICAS **INMUNOLÓGICAS**

1. Inmunofluorescencia directa (DIFT)
2. ELISA detección antígeno



(C) AISLAMIENTO VIRAL Y TÉCNICA DE LA **HEMOADSORCIÓN DEL VPPA**



- **SANGRE COMPLETA (EDTA)**
- **SUERO**
- **ÓRGANOS**
- **MÉDULA ÓSEA**
- **GARRAPATAS blandas**
género *Ornithodoros* (vectores)



Detección de anticuerpos

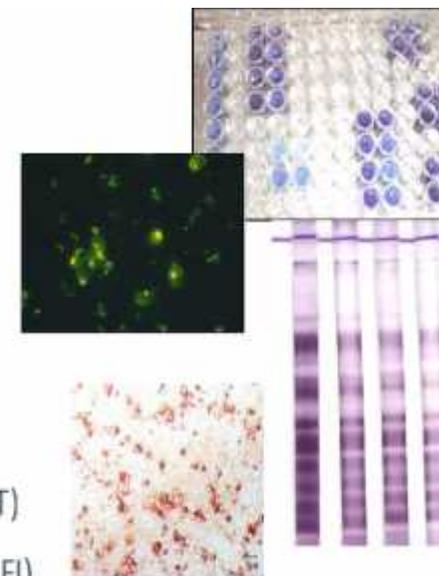


(A) "SCREENING" mediante ELISA

1. OIE-ELISA (ELISA indirecto)
2. ELISAS COMERCIALES (INGENASA, IDVET, SVANOVA)

(B) Técnicas de confirmación

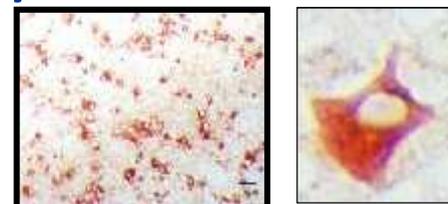
1. Técnica del Immunoblotting (IB)
2. Técnica de la inmunoperoxidasa indirecta (IPT)
3. Técnica de la inmunofluorescencia indirecta (IFI)



○ SUERO

○ EXUDADOS/HOMOGENIZADOS DE ÓRGANOS y médula ósea (técnica de inmunoperoxidasa IPT e IFI)

○ FLUIDOS



MUESTRAS ALTERNATIVAS

Los estudios de evaluación realizados por diferentes grupos con muestras experimentales han demostrado el uso potencial de las muestras alternativas en el diagnóstico de la PPA:

- Fluido oral
- Hisopos: sangre, tejidos, orales y nasales
- Muestras de sangre seca
- Muestras de jugo de carne
- Esponjas secas (dry-Sponges)



GAPS

Validación utilizando muestras de campo y tests de diagnóstico validados tanto para detección del virus como para la detección de anticuerpos.

Sensibilidad depende del tipo de cepas circulantes (virulencia)

Pool sangre para el diagnóstico de PPA mediante la técnica de PCR

No disminuye la sensibilidad de las técnicas cuando tenemos una gran cantidad de ADN viral (Ct <30), independientemente de la PCR analizada.

CT RANGE	% Sensitivity OIE REAL TIME PCR			% Sensitivity UPL REAL TIME PCR		
	3 POOLED	5 POOLED	10 POOLED	3 POOLED	5 POOLED	10 POOLED
<20	100	100	100	100	100	100
20-30	100	100	100	100	100	100
30-35	100	86	29	100	100	60
>35	100	43	0	100	97	33

La sensibilidad se reduce considerablemente cuando se realizan pooles >3 la carga de DNA viral es superior a Ct>30.

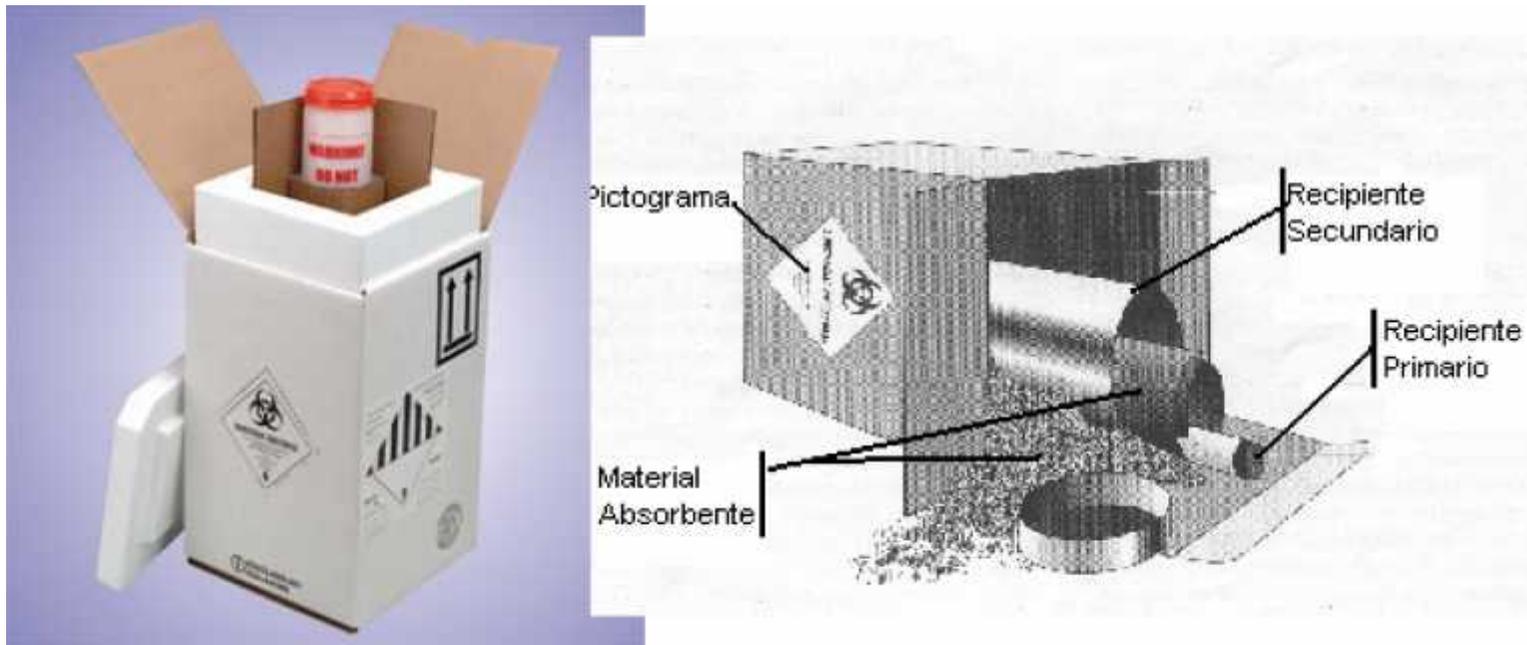
CT RANGE	% Sensitivity OIE REAL TIME PCR			% Sensitivity UPL REAL TIME PCR		
	3 POOLED	5 POOLED	10 POOLED	3 POOLED	5 POOLED	10 POOLED
<20	100	100	100	100	100	100
20-30	100	100	100	100	100	100
30-35	100	86	29	100	100	60
>35	100	43	0	100	97	33

ENVÍO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS MATERIAL BIOLÓGICO



ENVÍO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS:

Debe realizarse de acuerdo con la **NORMATIVA INTERNACIONAL, NACIONAL Y REGIONAL**



Si la entrega se realiza en un plazo superior a 48 horas, se recomienda su transporte y almacenaje con nitrógeno líquido o -70°C .

Documentación de las muestras

Epidemiological information			
Reason for sending the samples (marked with X)	Symptomatic		
	Surveillance		
	Necropsy		
	Died off		
	Confirmation		
ASF related symptoms (marked with X)		Date of onset	Duration
	Sudden death		
	Acute fever		
	Lethargy		
	Anorexia		
	Erythema		
	Recumbency		
	Abdominal pain		
	Diarrhea		
	Vomiting		
	Cyanosis		
	Coughing		
	Blood faeces		
Others:			
Travel History with dates (include in- and out-of-state)			
Human/Animal/Arthropod Contact (specify)			
Previous Laboratory Results			
Previous ASF outbreak (give dates)			
Additional Information:			

Información epidemiológica completa.

Requisitos para el TRANSPORTE de MATERIAL BIOLÓGICO al laboratorio de diagnóstico para la PPA

CAPÍTULO 1.1.3.



TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO

“En interés de la salud humana y animal, el material biológico obtenido de animales debe transportarse de manera segura, eficiente y legal desde el lugar donde se obtiene hasta el lugar donde se analiza, estudia o utiliza.”

REMITENTE

TRANSPORTISTA

DESTINATARIO



**COORDINACIÓN.
RESPONSABILIDAD.**



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Centro Nacional Instituto de Investigaciones
y Tecnología Agraria y Alimentaria

TRANSPORTE de MATERIAL BIOLÓGICO

Categorización de las sustancias infecciosas

- Muestras sospechosas para el diagnóstico de la PPA

CATEGORÍA B → UN 3373

- Cultivo: virus PPA

CATEGORÍA A → UN 2900

Sustancia infecciosa que afecta a animales

(En caso de duda sobre si una sustancia cumple o no los criterios, debe asignarse a la Categoría A)

- **MUESTRAS EXENTAS:** no sujetas a la normativa de sustancias peligrosas.
 - Muestras de estudios de vigilancia.
 - Muestras para controles de exportación de animales sanos.
 - Muestras para estudio estado inmunitario de animales o poblaciones.

Sistema de triple embalaje.

APÉNDICE 1.1.3.2.

EJEMPLO DEL SISTEMA DE EMBALAJE TRIPLE (RECOMENDACIONES DE LA IATA) PARA EL EMBALAJE Y ETIQUETADO DE DISTINTOS TIPOS DE MATERIAL BIOLÓGICO



Fig. 3. Ejemplo del sistema de embalaje triple para el embalaje y etiquetado de sustancias infecciosas de la Categoría A: UN2814 y UN2900 (por cortesía de la IATA, Montreal, Canadá).

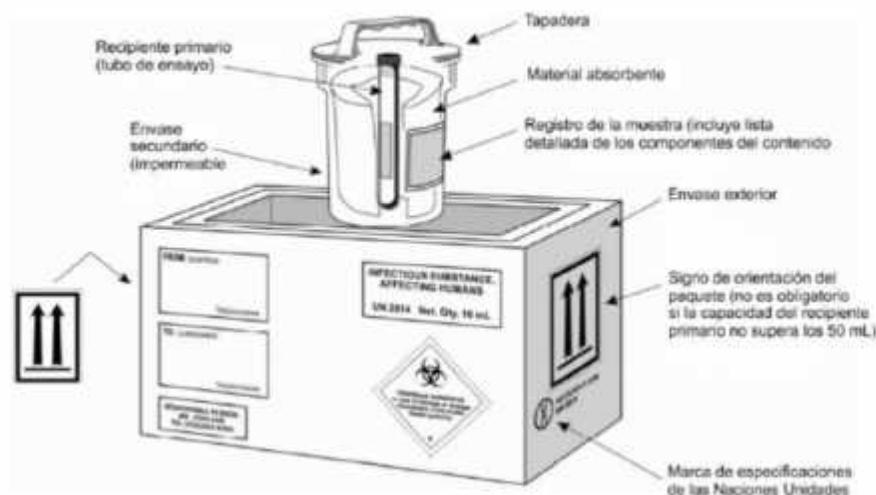
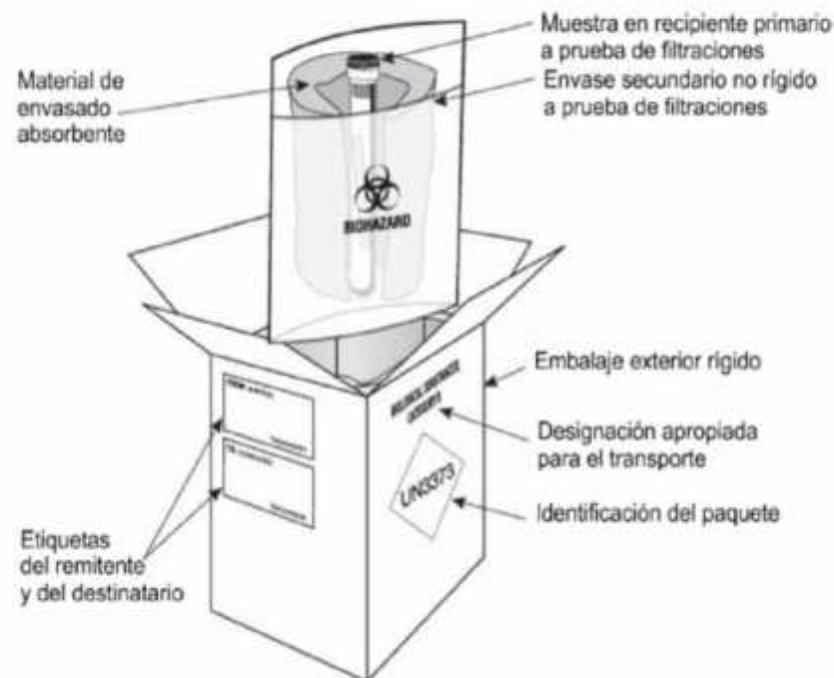




Fig. 5. Ejemplo del sistema de embalaje triple para el embalaje y etiquetado de sustancias infecciosas de la Categoría B, UN3373 con envase secundario no rígido a prueba de filtraciones (por cortesía de la IATA, Montreal, Canadá).



CONSIDERACIONES PARA EL MANEJO Y TRABAJO CON MUESTRAS SOSPECHOSAS DE PPA



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Centro Nacional Instituto de Investigaciones
y Tecnología Agraria y Alimentaria

EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA debe
manipularse en los laboratorios aprobados por
las **AUTORIDADES COMPETENTES SIGUIENDO**
LAS DIRECTRICES DE BIOCONTENCIÓN DE
AGENTES PATÓGENOS DEL GRUPO 3

Consideraciones para el manejo y trabajo CON MUESTRAS SOSPECHOSAS DE PPA en Lab BSL -2

Si NO se dispone de un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (BSL-3).

- Disponer de área restringida con control y registro de acceso.
- Habilitar una sala para cambio de ropa y calzado.
- Manipular las muestras en cabina bioseguridad Clase II.
- Descontaminar superficies, equipos y material.
- Gestión controlada de residuos y muestras.
- FORMACION DEL PERSONAL.



- **Análisis por PCR:** el primer paso de la extracción de ADN debe realizarse en cabina de bioseguridad de clase II (Buffer de lisis): inactivación del virus. Después se puede trabajar en la mesa de laboratorio.
- **Análisis serológico:** Inactivación muestras de suero mediante tratamiento térmico (**56°C - 70 min**). Después se puede trabajar en la mesa de laboratorio ELISA/IB/IPT.

EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA debe manipularse únicamente en los laboratorios aprobados por las AUTORIDADES COMPETENTES

<https://asf-referencelab.info/asf/en/>



AFRICAN SWINE FEVER (ASF)

[HOME](#) [ANNUAL MEETINGS](#) [THE DISEASE](#) [EURL FOR ASF](#) [ASF DIAGNOSIS](#) [DIAGNOSTIC SERVICES](#) [SEQUENCE DATA BASE](#) [LINK](#)

**WELCOME TO THE EUROPEAN
UNION REFERENCE LABORATORY
FOR AFRICAN
SWINE FEVER (EURL-ASF).**
CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (INIA-CISA)



 EU Reference Laboratory for ASF
Animal Health Reference Centre
(EURL-ASF)
Ctra. Algorta s/n
48940, Leizor (Bizkaia), Spain  

 EURL.ASF@INIA.ES

 [NATIONAL REFERENCE LABORATORIES FOR ASF](#)

ASF NOTIFICATIONS 



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



*Muchas gracias
por su atención*



EU Reference Laboratory for ASF
Animal Health Research Centre
(CISA), INIA
Ctra Algete-El Casar s/n
28130, Valdeolmos, Spain



nieto.raquel@inia.es