

XX

SIMPOSIO ANUAL DE AVEDILA GIJÓN, ASTURIAS

**PALACIO
DE
CONGRESOS**



5 Y 6 DE NOVIEMBRE 2015

**LIBRO
DE PONENCIAS**

ASOCIACIÓN DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EN DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

www.congresoavedila2015.es • info@congresoavedila2015.es

Organizadores:



GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERÍA DE DESARROLLO RURAL
Y RECURSOS NATURALES

LABORATORIO SANIDAD ANIMAL

XX SIMPOSIO ANUAL DE AVEDILA GIJÓN, ASTURIAS

**ASOCIACIÓN DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS
EN DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

5 y 6 de noviembre de 2015





COMITÉ ORGANIZADOR

CONSEJERÍA DE DESARROLLO RURAL Y RECURSOS NATURALES;
GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

Ibo Álvarez González

Dirección General de Ganadería

Javier Amado Fernández

Laboratorio de Sanidad Animal

Pablo Arenas Valls

Laboratorio de Sanidad Animal

M^a Francisca Copano Romero

Laboratorio de Sanidad Animal

Alberto Espí Felgueroso

Centro de Biotecnología Animal (SERIDA)

Itziar Fernández Martínez

Laboratorio de Sanidad Animal

Yolanda Martín Gómez

Laboratorio de Sanidad Animal

Tania Rubio Fernández

Laboratorio de Sanidad Animal



COMITÉ CIENTÍFICO

Ramón Juste Jordán

NEIKER-Tecnalia

Concha Caballero Galván

Unidad de Análisis de Sanidad Animal (UASA); Generalitat Valenciana

Carmina Nogareda Burch

ETSEA; Universidad de Lérida

Josep Carrera Mauri

Laboratorio de Sanidad Ganadera de Vic; Generalitat de Catalunya

Marta Eulalia García Sánchez

Facultad de Veterinaria; Universidad Complutense de Madrid

José-Marín Sánchez Murillo

Laboratorio Regional de Sanidad Animal; Junta de Extremadura

Lourdes Porquet Garanto

Laboratorios HIPRA, S.A.

Mariano Morales Amella

Laboratorios ALBEITAR

Virginia Vigo López

Laboratorio de Sanidad Animal de Canarias; Gobierno de Canarias

Juan Antonio Castillo Hernández

Departamento de Patología Animal; Facultad de Veterinaria de Zaragoza



ÍNDICE





Presentación:

Presentación.....	15
-------------------	----

Ponencias:

Potencial terapéutico de las células madre mesenquimales Dr. Francisco Vizoso Piñeiro <i>Unidad de Investigación Fundación Hospital de Jove (Gijón-Asturias)</i>	21
Control de enfermedades en acuicultura continental Dra. Isabel Márquez Llano-Ponte <i>Área de Sanidad Animal-Ictiopatología</i> <i>Centro de Biotecnología Animal (SERIDA)-Asturias</i>	25
Diagnóstico laboratorial de las enfermedades neurológicas de los rumiantes Dr. Lorenzo González Angulo <i>Animal and Plant Health Agency-Reino Unido</i>	28
Epidemiología y control de la tuberculosis animal Dra. Ana Balseiro Morales <i>Área de Sanidad Animal. Centro de Biotecnología Animal (SERIDA)-Asturias.....</i>	43
Las micotoxinas en producción animal: un problema reemergente de difícil solución Dr. Antonio J. Ramos Girona <i>Catedrático de Tecnología de Alimentos. Universitat de Lleida</i>	45
Nuevas técnicas diagnósticas de linfoma y leucemia en pequeños animales Dr. Antonio Meléndez Lazo <i>Servicio de Hematología Clínica Veterinaria</i> <i>Universidad Autónoma de Barcelona</i>	53



Exploración laboratorial renal y hepática

Dr. Mariano Morales Amella

Director de Laboratorios Albéitar y Profesor Asociado de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

58

Parásitos hemáticos transmitidos por garrapatas de interés en pequeños animales

Dr. Ángel Sainz Rodríguez

Departamento de Medicina y Cirugía Animal

Hospital Clínico Veterinario Complutense. Facultad de Veterinaria, UCM

77

Auditorías estatales de laboratorios en Irlanda: ejemplo del BVD y encefalopatías espongiformes

Dr. José María (Chema) Lozano Cantín

Sección de Virología de los Laboratorios Veterinarios

Department of Agriculture Food & the Marine (DAFM)-Irlanda

84

Comunicaciones:

01. Garrapatas ixódidas en vacuno de carne de Asturias: especies, prevalencia y estacionalidad

91

02. Aplicación de un ELISA desarrollado para gamos (*Dama dama*) en el inmunodiagnóstico de la paratuberculosis bovina

92

03. *Clostridium difficile*, un patógeno sin barreras.....

94

04. Prevalencia de *Clostridium difficile* en perros con enfermedad digestiva

95

05. Nuevas herramientas de diagnóstico para la detección temprana de peste porcina africana.....

96

06. Evaluación de la eficacia y seguridad de inmunoterapia desensibilizante en perros alérgicos

97

07. Detección de anticuerpos IgG e IgM específicos de *M.Bovis* en cerdos y jabalíes.....

98



08. Aproximación a un ensayo DIVA para el virus West Nile.....	100
09. Evaluación de la proteína de fase aguda haptoglobina a nivel sistémico y local mediante RT-qPCR e inmunodifusión radial en caballos con patología articular aguda.....	101
10. Aplicación del análisis de la dispersión de la cromatina para la valoración de la viabilidad de las MSCs caninas en usos terapéuticos.....	103
11. Evaluación de dos kits ELISA comerciales para la detección rutinaria de anticuerpos frente a <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> en cerdos	104
12. Diagnóstico e incidencia de tuberculosis en aves silvestres, exóticas y de corral.....	106
13. Necrosis hepática aguda en perros Carlinos	108
14. Estudio de seroprevalencia de la artritis-encefalitis caprina en Andalucía.....	109
15. Infección experimental de pavos con el virus Bagaza. Implicaciones en el diagnóstico de flavivirus	110
16. Diseño, calibrado y validación de estrategias de PCR para la detección de patógenos microbianos.....	111
17. Mejora en el diagnóstico de la neumonía bacteriana bovina causada por <i>Mannheimia haemolytica</i> e <i>Histophilus somni</i>	113
18. Diagnóstico de BHV1gE: nuevas soluciones y mejora en la sensibilidad de la detección de leche de tanques	115
19. Aplicación de la metagenómica al estudio de la paratuberculosis	117
20. Desarrollo de un ELISA tipo sándwich para la detección específica de la “nueva variante” del RHDV.....	118
21. Evaluación de la interferencia de la vacuna frente a PTB en el diagnóstico de TB bovina empleando diferentes antígenos	119

**Posters:**

P01. Nueva cita para España de <i>Culicoides paradoxalis</i> (Diptera: Ceratopogonidae). Caracteres morfológicos diferenciales y dinámica anual	123
P02. Diagnóstico clínico de habronemosis en ganado asnal (<i>Equus asinus</i> Linnaeus, 1758)	124
P03. Estudio comparativo de mohos y micotoxinas en dos variedades de maíz con diferente nivel de carotenoides destinadas a piensos para aves	125
P04. Serotipos de salmonela aislados en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de la Comunidad de Madrid en el período 2009-2015	127
P05. Prevención eficaz y diagnóstico rápido de la enfermedad hemorrágica (RHD) en conejos	128
P06. <i>Clostridium perfringens</i> en reservorios de agua del Zoo-Aquarium de Madrid: prevalencia y caracterización de los aislamientos	129
P07. Estudio de la sensibilidad <i>in vitro</i> a metronidazol de aislamientos de <i>Clostridium perfringens</i> de origen animal	130
P08. Sensibilidad antibiótica de aislamientos de <i>Staphylococcus</i> del grupo 'intermedius' de origen canino	131
P09. Influencia de la cortisolemia sobre el número de neutrófilos circulantes en yeguas cíclicas pura raza española	132
P10. Valoración de la glucemia, colesterolemia y trigliceridemia como marcadores de resistencia a la insulina en yeguas lactantes pura raza española	133
P11. Microbiota intestinal en rumiantes: desarrollo de nuevos probióticos	134
P12. Detección de Maedi-Visna en glándula mamaria mediante técnicas de inmunohistoquímica	135



P13. Aislamiento de <i>Brucella suis</i> en la población de jabalíes de Castilla y León de 2011 a 2014.....	136
P14. Diagnóstico serológico de la enfermedad de Gumboro comparando CIVTEST® AVI IBD con otros 3 kits comerciales.....	137
P15. Resistencia antimicrobiana de estafilococos aislados en pequeños rumiantes en Andalucía: estudio genético sobre presencia del gen <i>mecA</i> .	138
P16. Aplicación de aceites esenciales para el control de <i>Salmonella typhimurium</i> aislada de casos clínicos en diferentes especies animales	139
P17. Estudio de la actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales frente a <i>Streptococcus suis</i>	140
P18. Valoración del diagnóstico por RT-PCR de la besnoitiosis bovina	141
P19. Estudio comparativo de los kits ID Screen® Interferon Gamma Capture y Bovigam® en muestras recolectadas y activadas durante los años 2014 y 2015	142
P20. Nuevo método inmunoturbidimétrico para la determinación de proteína C-reactiva en suero de perro	143
P21. Nuevos métodos inmunoturbidimétricos para la determinación de las proteínas de fase aguda Pig-MAP y proteína C-reactiva en suero de cerdo	144
P22. Diagnóstico de <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> y <i>Brachyspira pilosicoli</i> en granjas porcinas españolas y susceptibilidad antimicrobiana de 137 aislados de <i>B. hyodysenteriae</i> durante el periodo 2011-2014.....	145
P23. Detección de la nueva variante del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo.....	147
P24. Validación de un método para la detección automática de residuos de antibióticos en leche cruda	148
P25. Determinación de los niveles de IgGs en muestras de leche de oveja de cisterna mediante test ELISA	150



PRESENTACIÓN



***Estimados colegas:***

Un año más, y por primera vez en Asturias, la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio (AVEDILA) organiza su XX Simposio. El Comité Organizador se complace en acoger en la ciudad de Gijón a congresistas y patrocinadores de toda España y confía en cumplir los objetivos básicos que persigue este simposio anual. La Asociación desea que este encuentro continúe consolidándose como foro de intercambio de información técnica y conocimiento científico entre todos los agentes implicados en el diagnóstico laboratorial en el campo de la Sanidad Animal: investigadores, estudiantes, empresas farmacéuticas, laboratorios e instituciones públicas y privadas.

Para esta edición, se ha preparado un excelente programa de ponencias sobre temas de gran actualidad, impartidos por científicos de ámbito nacional e internacional. Además de las ponencias generales, se van a presentar numerosos trabajos científicos tanto en formato de comunicación oral como en formato poster, donde se darán a conocer los resultados de los últimos proyectos de investigación en el ámbito del diagnóstico veterinario. Aprovechamos esta oportunidad para agradecer a todos los participantes su interés en el simposio y la aportación al mismo de sus trabajos científicos.

El Comité Organizador también quiere agradecer su colaboración a todas las instituciones y empresas patrocinadoras de este evento, cuya celebración ha sido posible gracias a sus aportaciones.

Esperamos que todos los asistentes disfrutéis de la hospitalidad, gastronomía y cultura que ofrece Asturias en general y la ciudad de Gijón en particular, y que el contenido científico de la reunión sea de interés para todos.

Saludos.

El Comité Organizador



PONENCIAS





POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Dr. Francisco Vizoso Piñeiro

Unidad de Investigación, Fundación Hospital de Jove, Gijón, España

La medicina regenerativa se está convirtiendo en una auténtica alternativa potencial para muchas enfermedades humanas crónicas. Las enfermedades especialmente candidatas a la medicina son ese amplio abanico de procesos que cursan con una pérdida de tejido y/o inflamación. Esas enfermedades pueden ser agudas, como las pérdidas de tejido vascular que ocurren por ejemplo en infarto de miocardio o en el ictus cerebral, y las pérdidas de tejido de origen traumático o infeccioso. Pero sobre todo las numerosas enfermedades en las que existe una pérdida de tejido o inflamación de forma crónica. Este último grupo de enfermedades incluye las degenerativas (Alzheimer, Parkinson, artrosis o ELA), autoinmunes (lupus, artritis reumatoide, espondilitis o enfermedad inflamatoria intestinal), así como otras patologías entre las que se incluye la fibrosis quística o la diabetes.

La medicina regenerativa se basa en la utilización de células madre, que muestran una elevada capacidad duplicativa y la de transformarse potencialmente en diferentes tipos celulares. Existen varios tipos principales de células madre: las embrionarias, las obtenidas por transferencia nuclear, las células pluripotenciales inducidas (iPS, por sus siglas en inglés), y las denominadas células madre del adulto. Las células madre embrionarias tienen una elevadísima capacidad proliferativa y pueden transformarse mediante los estímulos adecuados en los diferentes tipos celulares del organismo humano. Sin embargo, tienen el inconveniente de problemas éticos derivados de su utilización en investigación o terapéutica, y que se sabe que trasplantadas a animales de experimentación pueden dar lugar a un tipo de tumores muy agresivos denominados teratomas.

La técnica de transferencia celular consiste en que a un óvulo se le retira su ADN del núcleo y se le incorpora el de una célula adulta, posteriormente se desarrolla un embrión, y en la fase de mórula se obtienen células madre que se pueden diferenciar a diferentes tipos de células. Las iPS se consiguen mediante la inyección de al menos tres genes clave (Oct-3/4, SOX2 y Klf4) mediante retrovirus a fibroblastos de la piel. Así se consigue reprogramar células del adulto a embrionarias



y, a partir de estas últimas, diferentes tipos de células de diferentes tejidos. No obstante, la utilidad clínica de estos dos últimos tipos de células representa aún una incógnita. En cambio, de las que se tiene más experiencia es de las células madre del adulto, estando registrados hasta la fecha más de 5.000 ensayos clínicos en el mundo sobre su aplicación en muchas enfermedades.

Desde hace fechas relativamente más recientes se sabe de la existencia de células madre en el adulto en casi todos los tejidos del organismo. Las que más se están utilizando para fines de investigación en ensayos clínicos son las obtenidas del cordón umbilical, de la grasa, mediante liposucción, y las de la médula ósea, mediante punción de la médula ósea. Las células madre del cordón umbilical tienen los siguientes inconvenientes: solo se pueden obtener en el momento que nace el individuo, tienen una capacidad limitada de transformarse en otros tipos celulares, ya que lo hacen preferentemente a células del sistema hematopoyético, y que solo pueden ser conservadas en torno a unos 20 años, siendo más allá de esa edad cuando acontecen la inmensa mayoría de las enfermedades crónicas. Estas células madre del adulto tienen la ventaja de que, al ser del mismo individuo, no ocasionan rechazo cuando son trasplantadas al mismo sujeto. Si bien, en la actualidad se considera como válida la administración heteróloga de las células, ya que inducen inmunotolerancia.

Las células madre del tejido adiposo representan el tipo de células madre del adulto que más se están utilizando para ensayos clínicos. Sin embargo, tienen ciertos inconvenientes, como que para su obtención se requiere cirugía, o que su capacidad plástica, es decir, de transformarse en otros tipos de células, es más bien limitada. Además, muestran una capacidad de duplicación limitada, tras un número determinado de duplicaciones luego envejecen, pierden propiedades e, incluso, no está claro que no puedan producir tumores. Por tanto, toda esta perspectiva actual de la medicina regenerativa hace que sea necesario proseguir con las investigaciones intentando encontrar otras fuentes de células madre.

Recientemente, nuestro Grupo de Investigación ha aislado y caracterizado un nuevo tipo de células madre del adulto, que las denominamos hUCECs (del término "human uterin cervical stem cells"). Las hUCECs representan un nuevo tipo de célula madre del adulto que ofrece nuevas ventajas sobre las ya conocidas. Para su obtención no se requiere cirugía, ya que puede hacerse simplemente con la clásica citología ginecológica, presentan una capacidad de duplicación muy elevada, con los estímulos adecuados pueden dar lugar a una variedad de tipos



celulares, incluyendo osteocitos, condrocitos o adipocitos. Por otra parte, al igual o quizá de forma más potente que los otros tipos de células madre, las células madre uterinas (hUCESCs) tienen capacidad anti-inflamatoria. En este sentido, un aspecto relevante de las células madre de gran interés terapéutico es el de las sustancias que producen (secretoma), que las pueden convertir en fuente de una nueva generación de fármacos que pueden mitigar el efecto devastador de muchas enfermedades crónicas sobre el organismo.

A través de los diferentes experimentos realizados, se han podido observar diversas potencialidades de las hUCESCs que nos hace considerar a este tipo de células, y especialmente al medio condicionado derivado de las mismas, como un buen candidato a ser evaluado en un ensayo clínico con pacientes diagnosticados de ojo seco moderado a grave.

En relación con el cáncer, hemos observado que el medio condicionado (líquido que contiene las moléculas secretadas por las células) de las hUCESCs inhibe la proliferación in vitro de líneas de células tumorales de cáncer de colon (HT29), cáncer gástrico (AG5), cáncer de cervix (HeLa) y de cáncer de mama agresivo (MDA-MB-231). También hemos demostrado que el medio condicionado de las hUCESCs modifica el ciclo celular de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 e induce apoptosis de la misma, así como limita su capacidad de invasión. Además, el medio condicionado de las hUCESCs disminuye el crecimiento de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 in vivo, favoreciendo el proceso de apoptosis del tumor y aumentando la supervivencia de los animales. Por otra parte, considerando el creciente conocimiento sobre la implicación del estroma tumoral en la progresión de los carcinomas humanos, es de destacar que el medio condicionado de las hUCESCs no solo reduce la proliferación in vitro de células aisladas de tumores humanos con alto ratio de proliferación, sino también de fibroblastos asociados a tumores, así como su capacidad de invasión, además de inducir apoptosis temprana en los mismos.

En cuanto a su capacidad anti-inflamatoria, el medio condicionado de las hUCESCs inhibe y revierte la diferenciación a macrófago de una línea celular (U937). En cuanto a su posible interés clínico en el campo de la oftalmología, también hemos descrito que el medio condicionado de las hUCESCs favorece la regeneración de la capa epitelial de la cornea in vivo, y reduce el nivel de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en la cornea in vivo. Además, el medio condicionado de las hUCESCs tiene un efecto bactericida sobre *E. coli* y *Staphylococcus epidermidis*, incluido en lentes de contacto infectadas.



En relación con todos esos efectos, también cabe destacar que el medio condicionado de las hUCESCs contiene diferentes citoquinas con propiedades inmunoregulatoras (ej.: CXCL-16, CCL-28 y IL-17), anti-tumorales (ej.: FLT-3, LAP, IP-10 y LIGHT), regenerativas (ej.: PDGF, EGF, FGF, HGF y VEGF) y anti-microbianas (CXCL10/IP10, CXCL8/IL-8, CXCL1/GRO-a, CXCL6/GCP-2, CCL20/MIP-3a, y CCL5/RANTES). Es de destacar también que el medio condicionado liofilizado conserva las propiedades biológicas del medio condicionado fresco, facilitando así el manejo y aplicación en la clínica del medio condicionado.

En definitiva, los avances en el conocimiento de las propiedades de las células madre son muy esperanzadores de cara a futuros tratamientos para muchas enfermedades. Las investigaciones deben de seguir su curso. De una fase de estudios de laboratorio, debe seguir para todos los casos una de experimentación animal, en la que se compruebe la seguridad y la ventaja terapéutica de las células madre o sus derivados. A esa fase debe de seguir otra de ensayos clínicos en humanos y en sus diferentes fases. Solo si de esa forma, escalonada y racional, se obtienen resultados exitosos, la medicina regenerativa podrá ser una alternativa válida para muchas enfermedades. Investigaciones afines en el campo de la veterinaria podrían también tener un gran interés potencial.

Referencias bibliográficas

Eiró N., Sendón-Lago J., Seoane S., Bermúdez M.A., Lamelas M.L., García-Caballero T., Schneider J., Pérez-Fernández R., Vizoso F.J. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget* 2014. Volume and pages: 5(21):10692-708.

Bermúdez M.A., Sendón-Lago J., Eiró N., Treviño M., González F., Yebra-Pimentel E., Giráldez M.J., Macía M., Lamelas M.L., Saá J., Vizoso F., Pérez-Fernández R. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2015; 56(2):983-92.



CONTROL DE ENFERMEDADES EN ACUICULTURA CONTINENTAL

Dra. Isabel Márquez Llano-Ponte

Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario
del Principado de Asturias

La acuicultura ha empezado a despuntar como “agro-ganadería” en el concepto más amplio de estas palabras hace relativamente poco tiempo. De hecho en las estadísticas mundiales de la FAO se considera desde los años 60 del pasado siglo, anteriormente solo se registraba la pesca extractiva. Pero en los últimos años el crecimiento de la acuicultura ha sido exponencial. Actualmente, los productos obtenidos por métodos de acuicultura representan más del 50% de todos los productos acuáticos comercializados en el mundo. Paralelamente se están desarrollando todos los campos relacionados con la actividad desde la ingeniería para construcciones acuáticas, hasta campos de la biología de la reproducción, genética, nutrición, nuevas especies en cría y por supuesto el campo de la patología, medicamentos, vacunas, etc.

La acuicultura continental, “versus” acuicultura marina, se refiere a la cría en agua dulce. Son de acuicultura continental entre otras la tilapia, el panga, carpas, salmónidos, etc.

El diagnóstico en peces en comparación con cualquier otro campo de medicina tradicional incluida la medicina veterinaria está en el inicio.





El diagnóstico empieza por la toma de muestras en las instalaciones de acuicultura y estas en su concepto y función son variadísimas.

Una de las características fundamentales de la acuicultura y más concretamente la piscicultura es que el hábitat donde crecen los peces es muy influyente en el diagnóstico, hablamos permanentemente de poblaciones y se diagnostican sobre muestras de muchos peces, muy raramente sobre un solo individuo. La obtención de muestras “in situ” en la piscifactoría es determinante, como lo es el conocimiento de la especie con la que estamos tratando.

La mayoría de los problemas en piscicultura intensiva son multifactoriales, ya que se deben a la interacción entre el pez, el patógeno y el ambiente, por lo que, una única prueba nunca tiene valor diagnóstico por sí misma.

La aparición de una enfermedad se detecta en la piscifactoría mediante el registro diario de mortalidades en cada estanque de cría, la pauta que sigue esa mortalidad es la primera indicación sobre un problema medio ambiental o infeccioso. Otros síntomas como natación irregular, comportamiento alimentario, etc. aportan muchos datos fundamentales.

El examen clínico y la necropsia son fundamentales, ya que las pruebas laboratoriales frente a patógenos acuáticos son muy limitadas. Por otra parte la autólisis de los tejidos postmortem es un factor limitante para el diagnóstico. Las muestras ideales serían peces vivos “afectados”.

La primera fase del diagnóstico consiste en obtener un historial completísimo de la piscifactoría y del stock de peces donde se está produciendo el problema. Teniendo en cuenta que el medio ambiente puede influir en la enfermedad por diversas vías: temperatura, calidad del agua, fotoperiodo, tormentas, etc. La muestra que se toma debe de ser seleccionada muy cuidadosamente para que sea representativa, posteriormente se procede al traslado al laboratorio.

Las necropsias solo se realizan sobre peces recién muertos, menos de 24 horas si se conservan por debajo de los 4°C.

Pruebas diagnósticas en ictiopatología: anatomía patológica (especialmente en branquias), valoración de lesiones macroscópicas, realización de preparaciones histológicas, examen microscópico, parasitología, bacteriología: técnicas clásicas y PCR, virología: cultivos celulares y RT-PCR.



Un buen diagnóstico ayuda a poder actuar rápidamente minimizando pérdidas económicas, prevenir los próximos brotes infecciosos, evitar el abuso de antibióticos, decidir sobre el manejo de la piscifactoría: vacunas, densidad de carga, épocas de incubación, tamaño de venta, compra de peces, etc.

En el Área de Sanidad Animal del SERIDA se llevan a cabo actualmente tres programas de ictiopatología: Control de enfermedades virales de peces de declaración obligatoria (SHV-NHI) en Asturias. Control sanitario de las repoblaciones de ríos de Asturias. Estudio de enfermedades de anguilas en los ríos de Asturias.



DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE LAS ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS DE LOS RUMIANTES

Dr. Lorenzo González Angulo

Grupo en APHA-Lasswade

Las enfermedades neurológicas de los rumiantes, y en concreto las que afectan al sistema nervioso central (SNC), reciben quizá poca atención en comparación con las que afectan a otros órganos y sistemas y, sobre todo, con las patologías englobadas en la denominada “medicina de la producción”. Sin embargo, las enfermedades del SNC en las diversas especies animales, y los rumiantes no son una excepción, son muy numerosas y responden a muy variadas etiologías, probablemente al espectro de agentes causales más amplio de todos los compartimentos orgánicos. Por ello, al tiempo que un serio problema sanitario y productivo dado su pronóstico generalmente fatal, suponen un serio reto diagnóstico que solo puede abordarse desde el método y la experiencia.

Varios son los problemas que nos encontramos a la hora del diagnóstico de estas enfermedades y que al menos en parte condicionan esa relativa falta de atención que reciben. Por un lado, el diagnóstico clínico se ve comprometido por la falta de medios y experiencia para llevar a cabo una adecuada exploración neurológica y también porque en muchas ocasiones los signos clínicos son inespecíficos. Así, algunos signos que se refieren como neurológicos o nerviosos son simplemente reflejo de una muerte inminente, mientras que otros que realmente nos dirigirían a prestar atención laboratorial al SNC pasan desapercibidos. Por otro lado, al practicar una necropsia, el SNC no es inmediatamente visible y la extracción del encéfalo y la médula espinal requiere de un esfuerzo extra que, para proporcionar unas mínimas garantías, debe ser meticuloso y cuidadoso. Para complicar el panorama nos encontramos con que, en muchas aunque no en todas las enfermedades, el SNC no evidencia lesiones macroscópicas o estas son sutiles o poco esclarecedoras. Si reunimos todos los factores hasta ahora mencionados, llegamos a la conclusión de que el diagnóstico laboratorial etiológico es prácticamente inabordable como primera pauta y que se requiere una previa aproximación que encauce (y a veces incluso resuelva) el problema: el examen histopatológico.

Dados todos los condicionantes anteriores y la complejidad estructural y funcional del SNC, el examen histopatológico no puede abordarse con muestras



elegidas al azar o de una forma más o menos empírica. El tallado del encéfalo y de la médula espinal debe llevarse a cabo de acuerdo con un plan sistemático y metódico que permita el posterior examen de esas diversas estructuras. Ya desde hace muchos años ese método, universalmente aceptado, consiste en practicar secciones transversales (con alguna salvedad) en puntos o áreas predeterminados (Figura 1). El modelo que se muestra es el que proporciona el número mínimo de muestras que permite una adecuada valoración de las lesiones microscópicas teniendo en cuenta que el diagnóstico a la postre va a depender no solo del tipo de lesiones encontradas sino también de su localización o distribución.

Como ya hemos apuntado, el SNC de los rumiantes es asiento de toda la gama de procesos patológicos, es decir, trastornos vasculares (traumas, infartos, embolias...), neoplasias (primarias o metástasis), procesos degenerativos e inflamaciones. Dejamos a un lado los dos primeros grupos que por su carácter esporádico e individual tienen escasa relevancia en los animales de renta en general y en

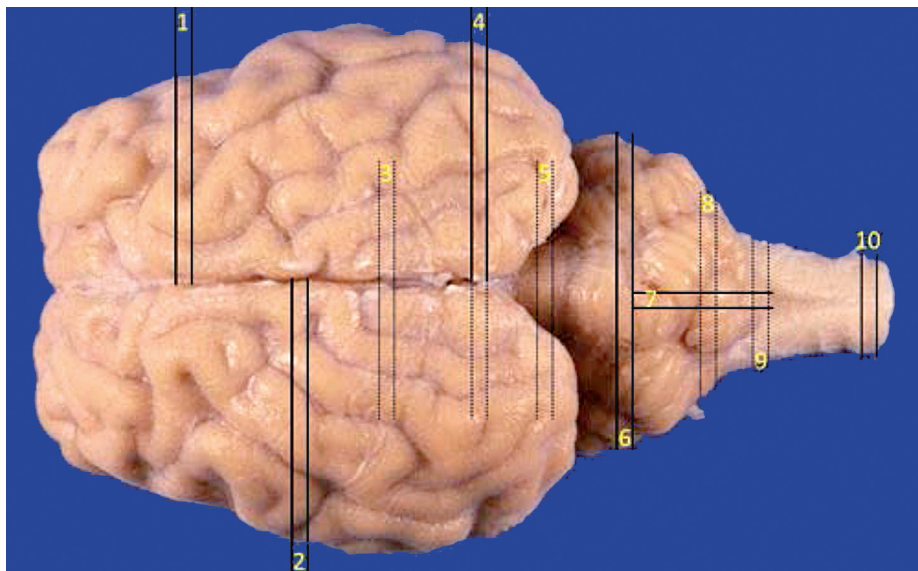


Figura 1. Distribución y localización de las secciones de encéfalo para examen histopatológico. Todas las secciones son transversales a excepción de la 7, que es sagital a nivel del vermis del cerebelo. Las secciones representadas por líneas sólidas incumben a todo el encéfalo, corteza y estructuras basales (1, corteza frontal y cuerpo estriado; 2, corteza parieto-temporal y tálamo rostral; 4, corteza occipital e hipocampo; 6, corteza cerebelosa y puente). Las secciones representadas por líneas de puntos solo afectan a estructuras basales (3, tálamo caudal; 4, mesencéfalo rostral; 5, mesencéfalo caudal; 8, médula oblongada rostral; 9, médula oblongada caudal [obex]). La sección 10 es de médula espinal cervical.



los rumiantes en particular y nos centramos en la degeneración y la inflamación. Sin embargo, por tratarse esta de una ponencia dirigida a especialistas en diagnóstico laboratorial y porque a veces la separación entre inflamación y neurodegeneración no es neta, las diversas enfermedades neurológicas las vamos a abordar desde el punto de vista de su etiología.

Enfermedades hereditarias o de base genética

En este grupo se engloban toda una serie de enfermedades neurodegenerativas que se manifiestan bien en el momento del nacimiento (malformaciones congénitas de base genética, no extrínseca) o transcurrido un tiempo variable tras el mismo (enfermedades neurogenéticas postnatales).

Las malformaciones congénitas causadas por anomalías cromosómicas o por mutaciones puntuales (espontáneas o hereditarias) en genes que regulan el desarrollo embrionario son en su mayoría macroscópicamente evidentes, de curso no progresivo y generalmente letal. Pueden manifestarse como:

1. Defectos de cierre del tubo neural (ej. anencefalia, espina bífida).
2. Déficits de inducción del encéfalo frontal (ej. holoprosencefalia, agénesis del cuerpo calloso).
3. Alteraciones de la migración neuronal y de la formación de surcos (ej. lisencefalia, paquigiria [Figura 2], polimicrogria).
4. Desórdenes de la proliferación o el tamaño (ej. megaencefalia, microencefalia).
5. Malformaciones del cerebelo y la médula espinal (ej. agénesis, hipoplasia y displasia del cerebelo, síndrome Dandy-Walker, malformación Arnold Chiari, mielodisplasias).
6. Alteraciones en las vías del líquido cefalorraquídeo (ej. hidrocéfalo congénito, hidromielia, siringomielia).

En contraste con las congénitas, las enfermedades hereditarias que se manifiestan transcurridas semanas o incluso meses después del nacimiento obedecen a mutaciones en genes que regulan el metabolismo celular en el SNC. Esas alteraciones metabólicas conducen a la degeneración selectiva de células nerviosas o sus componentes y terminan manifestándose en un cuadro neurológico progresivo causado por unas lesiones que son característicamente microscópicas, bilaterales y degenerativas. Estas enfermedades se pueden clasificar en:

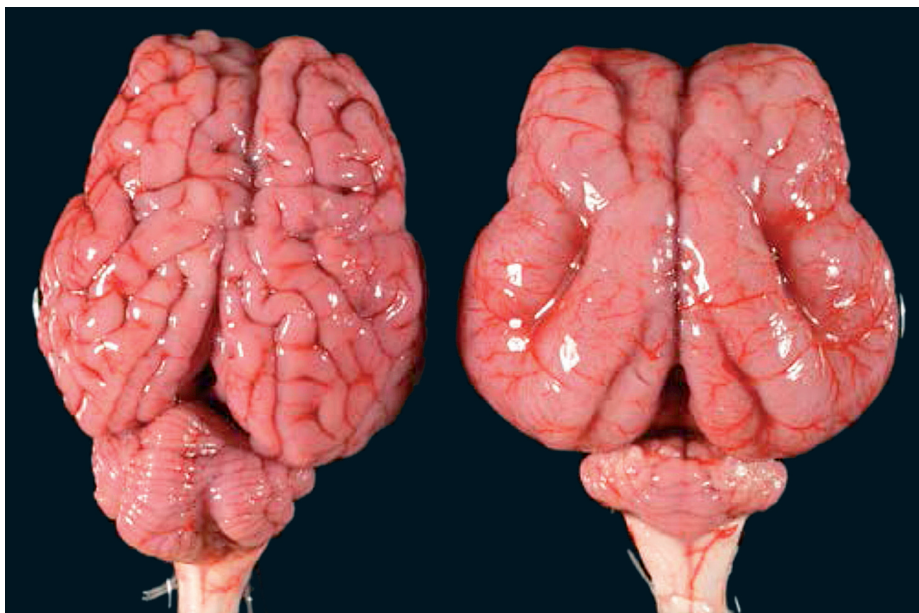


Figura 2. Paquigiria de la corteza cerebral (derecha) con rudimentaria formación de circunvoluciones y surcos (la ausencia total sería una agiria o lisencefalia) en un cordero mortinato comparado con otro normal (izquierda). Se aprecia también una hipoplasia del cerebelo (imagen cortesía de los Drs. Valentín Pérez y Julio Benavides, Universidad de León).

1. Degeneraciones neuronales (ej. enfermedades de las neuronas motoras, abiotrofias de la corteza cerebelosa [Figura 3]).
2. Degeneraciones axonales (ej. degeneraciones de tipo Wallerian, distrofias neuro-axonales, axonopatías segmentarias).
3. Defectos de la mielina (ej. leucodistrofias, disgénesis de la mielina).
4. Enfermedades del almacenamiento (ej. enfermedades del almacenamiento lisosomal, lipofuscinosis ceroides).
5. Degeneraciones espongiiformes (ej. acidurias orgánicas, citrulinemia).
6. Encefalomalacias simétricas selectivas (ej. encefalopatía simétrica necrotizante).

Enfermedades metabólicas y tóxicas

A la hora del diagnóstico, es difícil separar entre las enfermedades metabólicas (principalmente carenciales) y las intoxicaciones. Ello se debe a que los mecanismos patogénicos son comunes o similares y así también lo son las lesiones

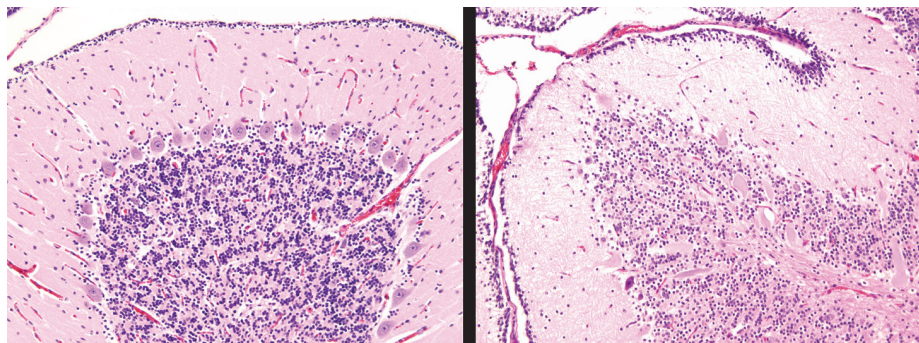


Figura 3. Abiotrofia de la corteza cerebelosa. En comparación con una corteza normal (izquierda), en la imagen de la derecha se observa un adelgazamiento de la capa molecular, necrosis y pérdida de células de Purkinje y presencia de axones tumefactos (torpedos) en la capa granulosa.

en el SNC, siempre de tipo degenerativo. Por esto último es fácil comprender la necesidad del diagnóstico diferencial de estos procesos con las enfermedades de base genética, sobre todo las post-natales, ya abordadas.

Desde el punto de vista histopatológico, la clave diagnóstica de estas enfermedades reside en determinar el tipo de degeneración y la distribución de las lesiones. En cuanto al primer factor, los grupos a considerar son las encefalomalacias (con o sin hemorragia), las lesiones selectivas y la espongiosis. En cuanto a la distribución, hay que diferenciar entre lesiones focales o multifocales, simétricas/bilaterales o asimétricas/unilaterales y que afectan a sustancia gris, blanca o ambas.

Dentro del grupo de las malacias o encefalomalacias, los ejemplos más sobresalientes son:

1. Afectando a sustancias gris y blanca, la encefalomalacia focal simétrica, causada por la toxina épsilon de *C. perfringens*.
2. Afectando a sustancia gris, la necrosis cerebrocortical, que con ligeras variaciones lesionales/topográficas puede estar causada por deficiencia de tiamina (Figura 4), por intoxicación por sulfuros, sal, plomo u organomercuriales, o por hipoglicemia y el denominado tambaleo por raigrás anual (toxina bacteriana que causa necrosis isquémica en la corteza cerebelosa).
3. Afectando la sustancia blanca, el “swayback” o deficiencia congénita de cobre, que produce lesiones de porencefalia (cavitación) en la corteza cerebral.

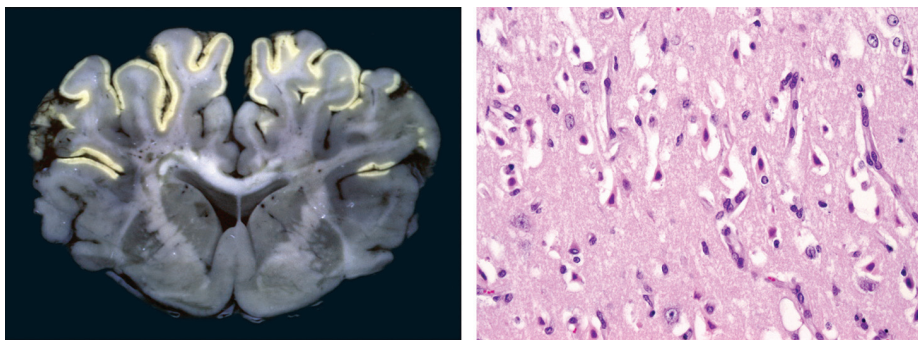


Figura 4. Necrosis cerebrocortical o polioencefalomalacia por deficiencia de tiamina. A la izquierda se observa autofluorescencia de las áreas de corteza cerebral afectadas, en las que las lesiones microscópicas corresponden a una espongiosis del neuropilo y necrosis hipóxica de neuronas piramidales (derecha).

En cuanto a los procesos o lesiones selectivas cabe destacar:

1. Los que afectan a neuronas, como la ataxia enzoótica (deficiencia post-natal de cobre), y la intoxicación por *Aspergillus clavatus*, que producen cromatolisis de neuronas motoras (aunque también desmielinización de tipo Wallerian en la médula espinal) y también las intoxicaciones por alpiste y otras toxinas vegetales (ej. swansonina, solanina), que provocan acúmulos de pigmentos, glúcidos o lípidos en lisosomas y a menudo provocan necrosis neuronal.
2. Los que afectan a axones, produciendo degeneraciones tanto de tipo Wallerian (ej. intoxicaciones por abrojo, sorgo y organofosfatos) como distróficas (intoxicaciones por hongos parásitos de diversas plantas o contaminantes de comida). Por último, dentro del grupo de las espongiosis, caracterizadas por lesiones vacuolares más o menos extensas en la sustancia blanca o en los límites entre blanca y gris, se encuentran diversas intoxicaciones (amonio, hexaclorofeno, closantel) y las denominadas encefalopatías metabólicas, que responden a fallo hepático y/o renal y en las que el acúmulo de determinados metabolitos, principalmente en astrocitos, conduce a un edema citotóxico (Figura 5).

Enfermedades parasitarias

Con la excepción de casos ocasionales de migración larvaria aberrante (ej. *Ela-phostrongylus spp.*, *Parelaphostrongylus spp.*), las helmintiasis del SNC de rumiantes tienen un único representante: la cenurosis. Esta se puede manifestar

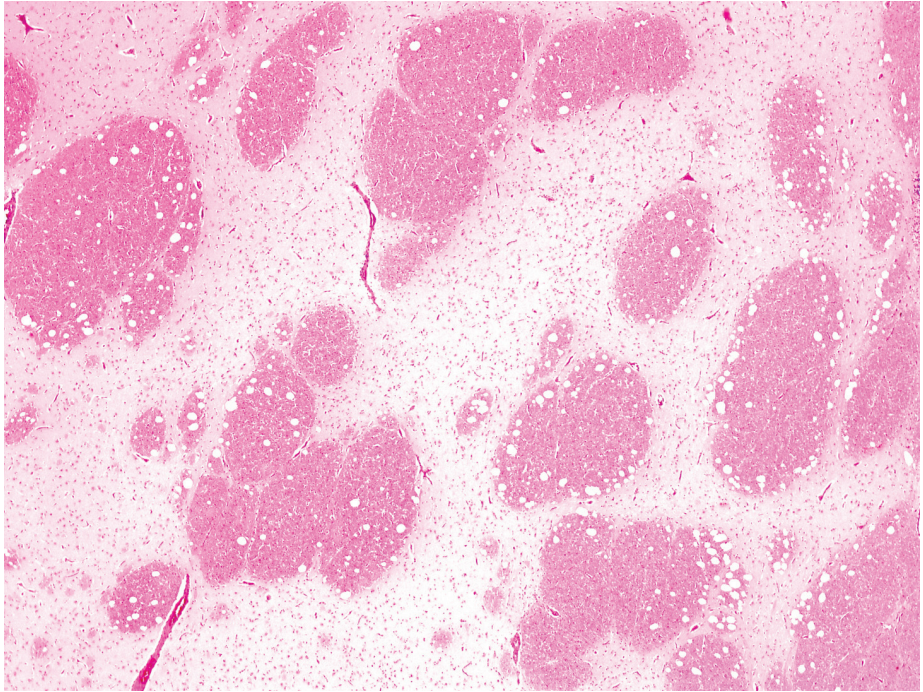


Figura 5. Encefalopatía hepatorenal. Se aprecia la característica presencia de vacuolas netamente delimitadas en la periferia de los haces de sustancia blanca de la cápsula interna.

en la fase crónica de vesículas maduras o durante la fase aguda de migración larvaria (Figura 6); en ambos casos se observa una respuesta inflamatoria de tipo granulomatoso, semi-purulento en torno a vesículas y trayectos, respectivamente.

Más importante que las helmintiasis, las infecciones por protozoos, especialmente *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, pueden ser causa de aborto y mortalidad perinatal en rumiantes. En estos casos, y al margen de lesiones inflamatorias en otros órganos fetales y en la placenta, los fetos y mortinatos presentan lesiones de encefalitis necrótica, no supurativa, de distribución multifocal y aleatoria (Figura 7). Lesiones similares junto con infiltrados inflamatorios perivasculares se pueden observar ocasionalmente en el SNC de ovinos y caprinos de cualquier edad infectados por *Sarcocystis spp.* En todos los casos, la inflamación es respuesta a la presencia de taquizoitos, y en mucha menor medida quistes tisulares.



Enfermedades bacterianas y fúngicas

Una forma de clasificar las enfermedades del SNC producidas por agentes infecciosos no víricos ni priónicos es distribuyéndolas en aquellas que cursan con lesiones focales, generalmente visibles macroscópicamente, y aquellas en que las lesiones son diseminadas y normalmente solo discernibles al microscopio.

Entre las enfermedades que cursan con lesiones focales se encuentran:

1. La tuberculosis, en la que las lesiones de necrosis caseosa rodeada de reacción granulomatosa pueden asentar en las meninges o en el neuroparénquima.
2. Los abscesos y focos de necrosis, que pueden reflejar septicemias por diversas bacterias (ej. *A. pyogenes*, *Pasteurella spp.*), o deberse a contaminación de lesiones traumáticas (ej. descornado, corte de cola). Mención especial

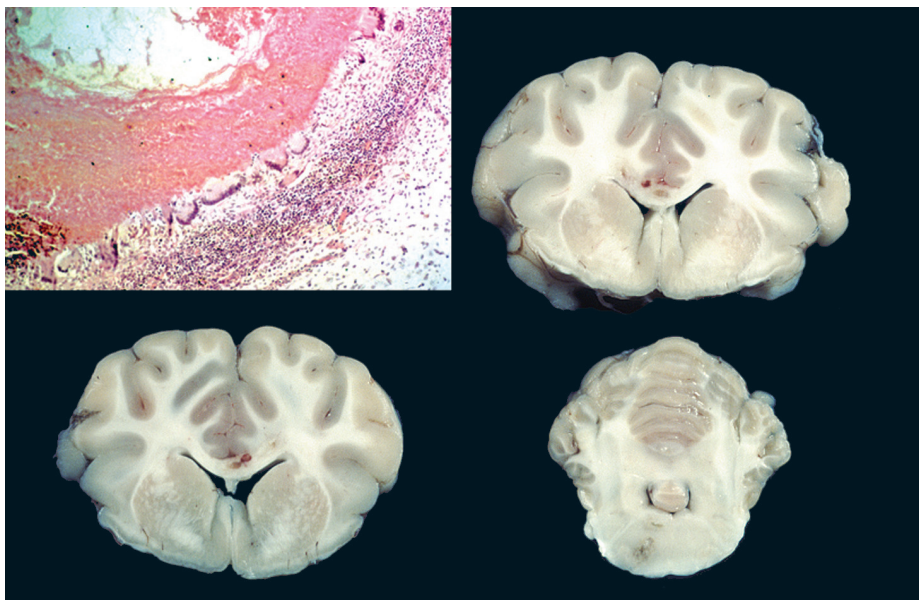


Figura 6. Cenurosis aguda. Macroscópicamente se observan los trayectos parasitarios en el puente del cerebelo y en el cuerpo calloso/giro cingulado. Microscópicamente dichos trayectos se corresponden con un área central de necrosis y hemorragia rodeada de una reacción inflamatoria con participación de células gigantes multinucleadas.

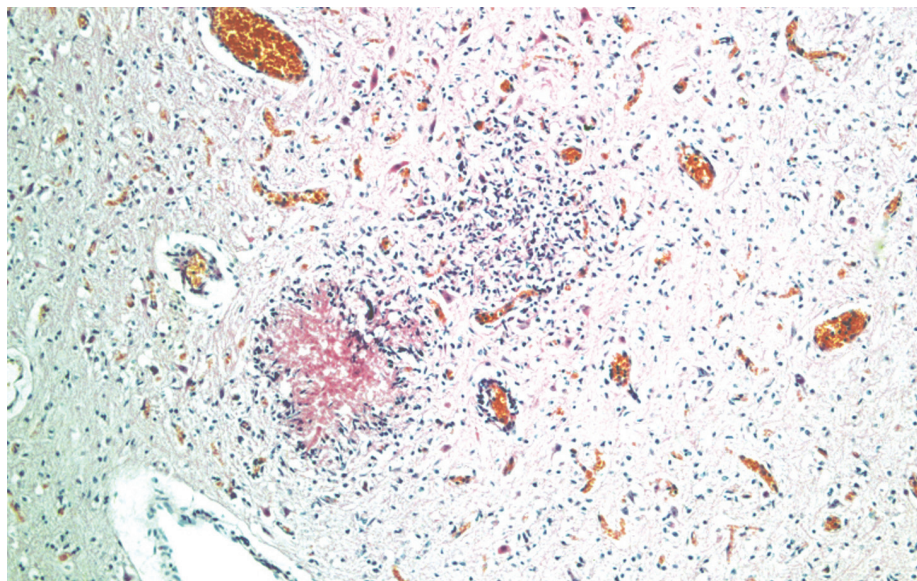


Figura 7. Neosporosis bovina. La infección fetal por este protozoo es causa de una encefalitis necrótica multifocal. En la imagen uno de tales focos de necrosis asociado a reacción inflamatoria glial.

merecen el denominado empiema de la silla turca (Figura 8), dado que ésta es diana frecuente de émbolos bacterianos, y los abscesos y necrosis focales en el cerebelo que se producen como consecuencia de una inflamación previa en el oído medio (ej. otitis media por *Mycoplasma bovis*).

Entre los procesos que cursan con lesiones diseminadas se pueden citar:

1. Las meningitis, coroiditis y ventriculitis purulentas como consecuencia de septicemias por diversas bacterias (ej. *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Pasteurella spp.*, *Staphylococcus spp.*) y hongos (ej. *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*).
2. La meningoencefalitis tromboembólica por *Histophilus somni*, que cursa con hemorragias multifocales infiltradas por neutrófilos y necrosis multifocal como resultado de la trombosis.
3. La listeriosis, en la que los microabscesos e infiltrados perivasculares linfohistiocitarios se localizan fundamentalmente en el tronco del encéfalo (Figura 9), dado que el acceso de la bacteria al encéfalo no es vía hematógena, sino a través de nervios craneales. Lesiones similares se describen en la melioidosis, aunque esta enfermedad está restringida a áreas tropicales.

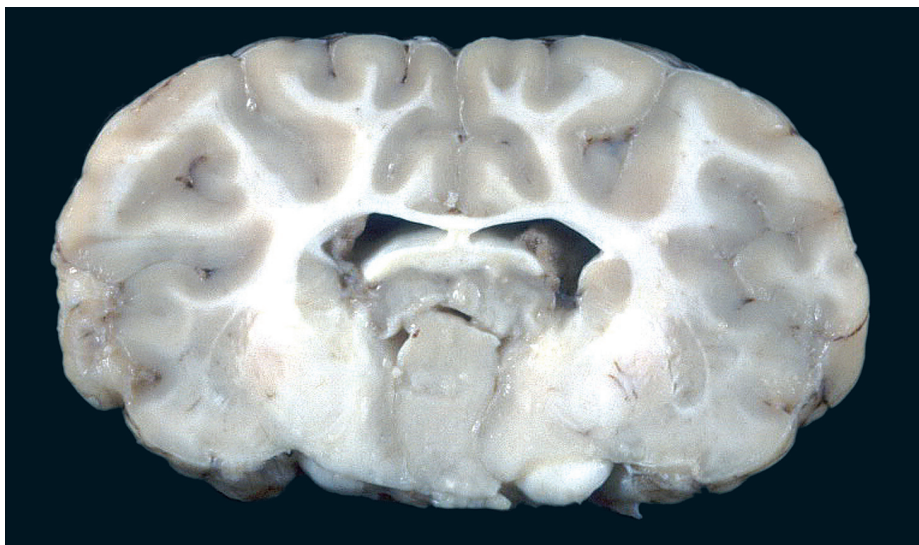


Figura 8. Empiema de la silla turca. La llegada de émbolos bacterianos a la *rete carotica mirabile* ocasiona la formación de abscesos/necrosis que se extienden focalmente al hipotálamo y tálamo.

Enfermedades víricas

Este es con toda probabilidad el grupo más numeroso de meningo/encéfalo/mielitis de etiología infecciosa en los rumiantes. Estas infecciones se pueden clasificar en tres grupos:

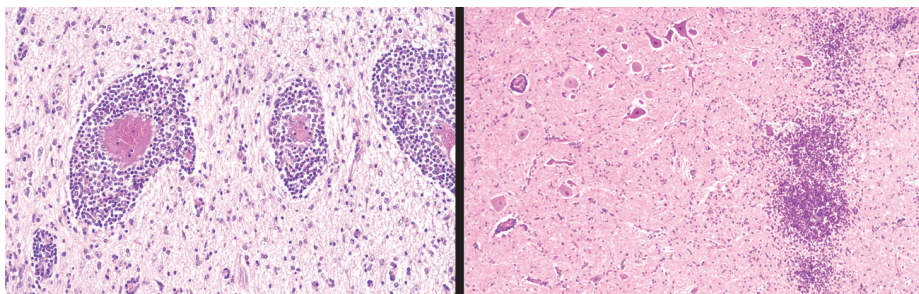


Figura 9. Listeriosis. En la forma neurológica de esta enfermedad, la bacteria asciende desde la cavidad oral por los nervios facial y/o trigémino hasta el puente del cerebelo y/o la médula oblongada. La reacción inflamatoria local a la multiplicación bacteriana se caracteriza por una infiltración perivascular severa linfo-histiocitaria (izquierda) y la formación de microabscesos en el neuroparénquima (derecha).



1. Infecciones por virus teratogénicos: tras infectar a una hembra gestante, estos virus atraviesan la placenta y tienen afinidad por el SNC del feto. Como resultado se producen una serie de anomalías del desarrollo en muchas ocasiones macroscópicamente evidentes (ej. hipoplasia cerebelosa, hidrocefalo, porencefalia, microencefalia), que es preciso diferenciar de las malformaciones congénitas de base genética ya comentadas. Esta diferenciación reside en la detección de lesiones microscópicas de meningo/encéfalo/mielitis linfocitaria o necrótica, vasculitis, gliosis multifocal, necrosis neuronal, hipomielinización, etc., que en proporciones variables acontecen en estas infecciones. Los principales virus teratogénicos de los rumiantes son los *Pestivirus* (diarrea vírica bovina [Figura 10], enfermedad de la frontera), los *Orivirus* (lengua azul) y los *Orthobunyavirus* (Akabane, Schmallenberg), siendo estos últimos los más asiduos causantes de defectos esqueléticos (braquignatia, torticolis, artrogriposis).
2. Infecciones post-natales por virus neurotrópicos: a diferencia de los anteriores, estos virus raramente causan lesiones macroscópicas en el SNC, pero el examen histopatológico revela lesiones de meningo/encéfalo/mielitis no supurativa (gliosis multifocal, perivasculitis mononuclear) que asientan en la sustancia gris y en ocasiones se acompañan de necrosis neuronal y neuronofagia. Entre las numerosas enfermedades de este grupo se encuentran la rabia (*Lyssavirus*), la enfermedad de Aujeszky (*Herpesvirus*) y la enfermedad de Borna (*Bornavirus*), en las cuales se pueden observar cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos o intranucleares y cuyos virus causales acceden al SNC vía nervios periféricos. También las encefalitis víricas transmitidas por garrapatas (*Flavivirus*, louping ill [Figura

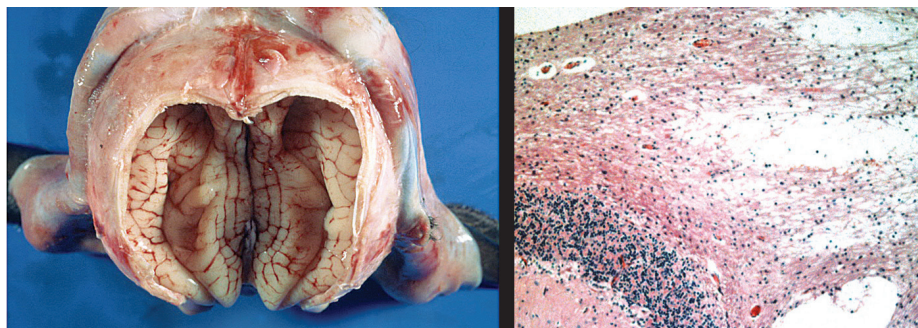


Figura 10. Las infecciones por pestivirus (virus BVD en la imagen) pueden ocasionar malformaciones congénitas detectables macroscópicamente, tales como hidrocefalia (izquierda) o hipoplasia cerebelosa que microscópicamente se caracteriza por hipomielinogénesis/porencefalia en la sustancia blanca (derecha).



11]), por mosquitos (*Flavivirus*, fiebre del Nilo oeste) y las infecciones por *Astrovirus*, en las que la neuroinvasión es por vía hematógica y la necrosis neuronal y neuronofagia son prominentes. Además de las citadas, que pueden afectar a pequeños y grandes rumiantes, cabe también citar dos exclusivas del ganado bovino. Una es la encefalitis por *Herpesvirus* bovino tipos 1 y 5 en la que la neuroinvasión es neurógena y las lesiones más graves en el cerebro anterior y en la corteza frontal y parieto-temporal. La otra es la fiebre catarral maligna (*Herpesvirus* ovino tipo 2), transmitida por contacto con ovinos portadores, en la que las lesiones más sobresalientes son las de una vasculitis mononuclear que asienta principalmente en las arterias de la *rete carotica mirabile*.

3. Infecciones por virus no neurotrópicos: este grupo está integrado únicamente por dos *Lentivirus*, el del Maedi-Visna ovino y el de la artritis-encefalitis caprina. Ambos acceden al SNC por vía sanguínea y del líquido cefalorraquídeo y producen lesiones casi siempre exclusivamente microscópicas. Su falta de tropismo específico por las neuronas hace que en muchas ocasiones las lesiones sean más evidentes en la sustancia blanca periventricular y funicular, definiéndose como una leucoencefalitis granulomatosa/necrótica, no supurativa, acompañada de leucomalacia secundaria o desmielinización primaria. Junto a los infiltrados histiocitarios, se observa una perivascularitis linfocitaria y una coroiditis linfoproliferativa característica (Figura 12).

Priones

Aunque la etiología de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) no está plenamente dilucidada, la tesis más aceptada es la de que se trata de la denominada proteína prión. Las dos enfermedades de este grupo son la encefalopatía espongi-

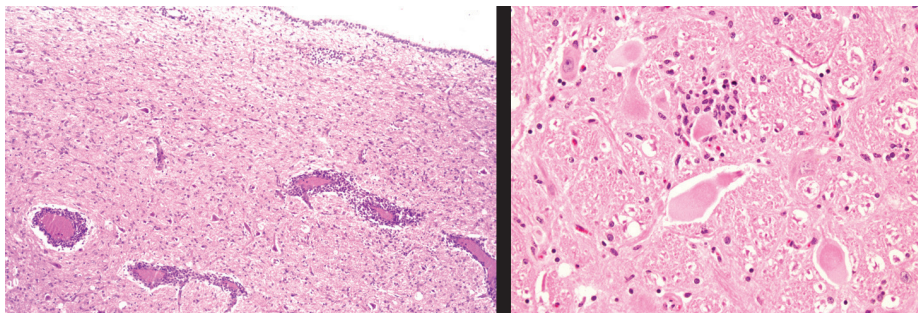


Figura 11. Louping ill. Las infecciones por flavivirus, y en general por virus neurotrópicos, se caracterizan por una encefalitis no supurativa (perivascularitis y gliosis; izquierda) y necrosis neuronal y, en ocasiones, neuronofagia (derecha).

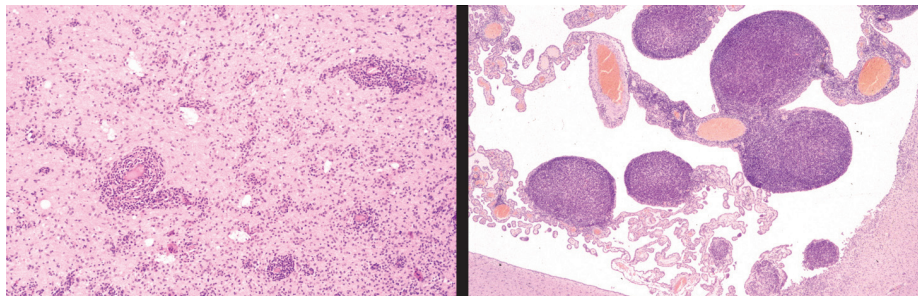


Figura 12. Visna. Las infecciones por lentivirus en pequeños rumiantes son multisistémicas, pudiendo ocasionar una encefalitis granulomatosa, generalmente afectando a la sustancia blanca.

forme bovina (EEB) y el scrapie ovino y caprino. En ambos casos las lesiones son exclusivamente microscópicas y consisten en una vacuolización o espongiosis del neuropilo y del soma neuronal que son típicamente simétricas y más evidentes en determinados núcleos (sustancia gris) del tronco del encéfalo (Figura 13). Otras lesiones ocasionales son una gliosis reactiva difusa, pérdida neuronal y depósitos de amiloide.

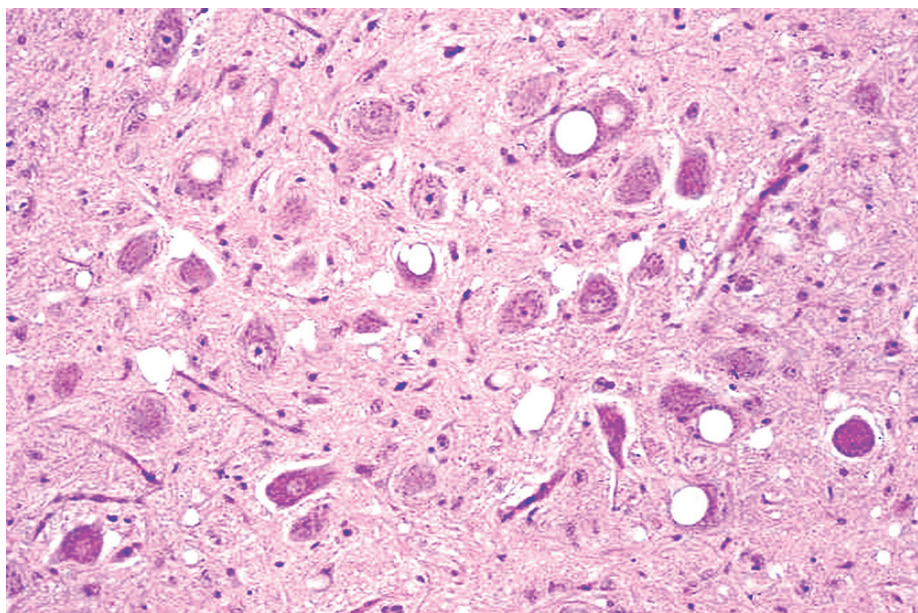


Figura 13. Encefalopatías espongiformes transmisibles. Las formas clásicas de estas enfermedades (scrapie en la imagen) se caracterizan por vacuolización del soma neuronal y del neuropilo, afectando a núcleos concretos, principalmente del tronco del encéfalo.



Esta descripción corresponde a las formas denominadas clásicas de EETs. Recientemente se han descrito formas atípicas de scrapie (Nor98) y de EEB (tipos L y H) en las que las lesiones vacuolares o no se observan o son de escasa magnitud y diferente distribución. Estas formas atípicas son esporádicas, transmisibles pero no contagiosas y solo tienen en común con las formas clásicas el acúmulo en el encéfalo de proteína príon anormal, pero de distinta morfología y distribución (Figura 14).

Algunas consideraciones finales

Confío en que este resumen, forzosamente incompleto y escueto, contribuya a proporcionar una idea de la numerosidad y variedad etiológica y lesional de las enfermedades neurológicas de los rumiantes. La identificación de las lesiones macroscópicas y, sobre todo, microscópicas, aunque no se trate de un abordaje estrictamente etiológico, es el único que al menos permite una aproximación inicial al diagnóstico y permite encauzar exámenes posteriores que lo confirmen o desmientan. Por un lado, la sospecha basada en el examen lesional puede contrastarse con datos de anamnesis y epidemiológicos o con análisis laboratoriales complementarios en animales de la misma explotación, bien clínicamente enfermos o expuestos al agente causal en cuestión. Por otro, debe tenerse en cuenta que trabajar con material fijado en formol e incluido en parafina no excluye necesariamente la realización de exámenes etiológicos complementarios y así un buen número de agentes infecciosos pueden detectarse por métodos inmunohistoquímicos o moleculares en dicho material. Además, el examen histopatológico

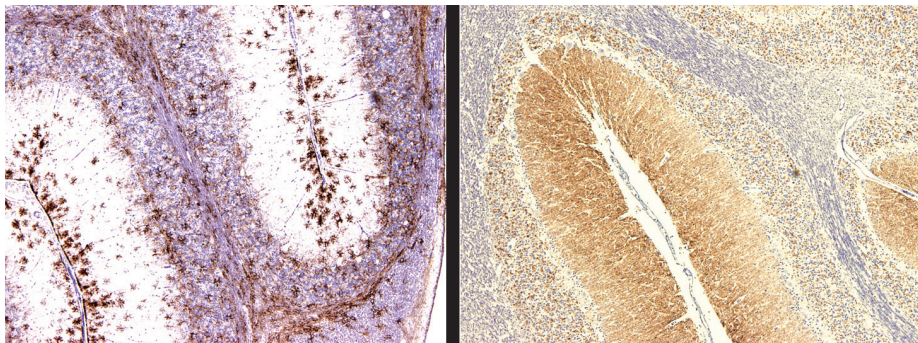


Figura 14. Encefalopatías espongiformes transmisibles. Tanto las formas clásicas (izquierda) como las atípicas (derecha) se caracterizan por el acúmulo de una forma anormal de la proteína príon. Sin embargo, la morfología, asociación celular y distribución de dichos acúmulos son diferentes en ambas formas.



rutinario puede acompañarse de la utilización de técnicas especiales de tinción que permitan una mayor especificidad diagnóstica.

En ocasiones puede resultar recomendable la toma de material fresco de SNC para la realización de análisis etiológicos que corroboren o descarten la sospecha lesional. Esto no resulta problemático con la médula espinal, pero sí con el encéfalo dada su fragilidad y la necesidad de garantizar un material óptimo y metódicamente seleccionado para el examen lesional. Para garantizar dicho material se debe por todos los medios minimizar la autólisis, evitar el uso de balas cautivas como método de eutanasia, procurar una fijación adecuada y evitar la congelación previa a la misma.

Por último, debe tenerse en cuenta que cuando una determinada enfermedad afecta a un colectivo, la presunción diagnóstica obtenida del examen lesional de un individuo puede corroborarse mediante análisis etiológicos en otros animales que posteriormente perezcan a consecuencia de la misma.



EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE LA TUBERCULOSIS ANIMAL

Dra. Ana Balseiro Morales

Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario
del Principado de Asturias

La tuberculosis animal es una enfermedad infecto-contagiosa granulomatosa crónica que afecta a diversos mamíferos domésticos y silvestres y muy excepcionalmente a aves. Está producida por especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, principalmente *M. bovis* y *M. caprae*. *Mycobacterium bovis* combina una de las más amplias gamas de hospedadores de todos los agentes patógenos, con un complejo modelo epidemiológico que engloba interacciones entre personas, animales domésticos y animales salvajes. La infección por tuberculosis animal en el hombre ocurre principalmente en países subdesarrollados a través del contacto directo con animales infectados (principalmente bovinos y caprinos) y del consumo de alimentos contaminados como es la leche sin pasteurizar.

El diagnóstico es la principal herramienta de vigilancia, seguimiento y erradicación en la mayoría de los países, incluido España. La investigación en el diagnóstico de la tuberculosis se centra en optimizar las pruebas oficiales (IDTB, detección de γ -IFN) y en desarrollar y evaluar nuevas técnicas o reactivos de diagnóstico con el objetivo principal de detectar a los animales infectados. Además, el desarrollo de técnicas diagnósticas DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) es otra de las metas en la actualidad. Estas técnicas tienen por objetivo distinguir entre animales vacunados e infectados.

Los antecedentes nos indican que para poder controlar la transmisión y persistencia de la tuberculosis en las zonas de contacto entre ganado doméstico y fauna silvestre es necesario comprender en profundidad su dinámica de transmisión, en cada escenario particular (Figura 1). Este conocimiento debe abarcar todos los reservorios potenciales, domésticos (caprino, ovino e incluso cerdo doméstico) y silvestres (jabalí, ciervo, gamo y tejón). Una vez conocidos los factores locales que operan, se deberán elaborar programas de mitigación del riesgo específicos para cada explotación en riesgo.

La vacunación es una de las estrategias de control de la tuberculosis que más esfuerzos está focalizando a nivel de investigación en los últimos años. A pesar del

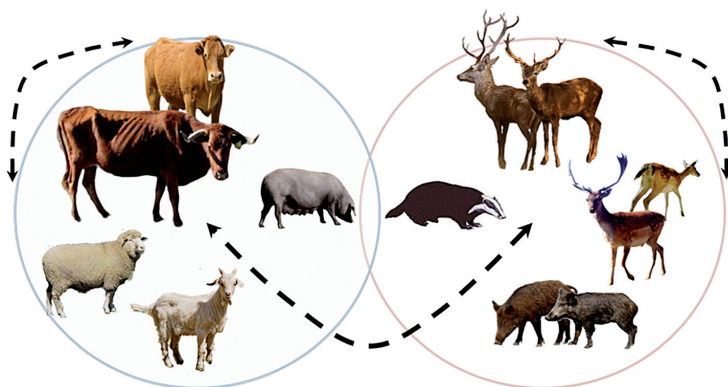


Figura 1. La tuberculosis es una enfermedad multi-hospedador. En la imagen se observan los actores domésticos y silvestres implicados en la transmisión de la tuberculosis que deben tenerse en cuenta en cada escenario particular.

éxito que ha supuesto la estrategia de “prueba y sacrificio” en la erradicación de la tuberculosis animal en muchos países, la vacunación, en determinadas situaciones epidemiológicas, se percibe como mejor opción a corto y medio plazo para el control de tuberculosis, particularmente en la fauna silvestre y, en su caso, en animales domésticos no sujetos a programas oficiales de erradicación. Sin embargo, el uso de vacunas puede interferir en el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado bovino, por lo que está específicamente prohibido su uso en esta especie. De ahí el esfuerzo por desarrollar técnicas DIVA que permitan diferenciar los animales vacunados de los infectados.

En la actualidad también se están llevando a cabo estudios de vacunación con un prototipo de vacuna inactivada de *M. bovis*. Esta vacuna obtiene resultados de protección muy satisfactorios en su aplicación a jabalí y que pueden además extrapolarse al cerdo doméstico. Los resultados preliminares indican un excelente nivel de protección con la vacuna inactivada. Estos resultados serán de gran interés para el control de la tuberculosis, ya que las vacunas inactivadas no parecen sensibilizar o hacerlo mínimamente frente a los test de diagnóstico, y suponen un nulo riesgo biológico para su uso en condiciones de campo. En los próximos años se estudiará (en condiciones de laboratorio) la respuesta de bovinos, caprinos, ovinos, ciervos y tejones.

En definitiva, se percibe un potencial excelente en investigación tanto en el diagnóstico como en el control de la tuberculosis, por lo que se esperan tener resultados aplicables en el campo en los años venideros, con el objetivo último de poder mejorar la situación actual de prevalencias que tanto preocupa a todos los sectores implicados.

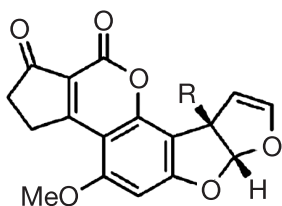


LAS MICOTOXINAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL: UN PROBLEMA REEMERGENTE DE DIFÍCIL SOLUCIÓN

Dr. Antonio J. Ramos Girona (ajramos@tecal.udl.es)

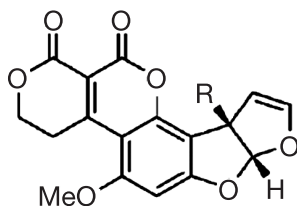
Departamento de Tecnología de Alimentos, Unidad de Micología Aplicada,
XaRTA-UTPV, Agrotecnio Center. Universidad de Lleida

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios que cuando son ingeridos, inhalados o absorbidos a través de la piel pueden causar enfermedades, o incluso la muerte, tanto en hombres como en animales. El inicio de la micotoxología moderna nace con el episodio de la denominada “enfermedad X de los pavos” y el descubrimiento de las aflatoxinas. Actualmente se conocen más de 20 aflatoxinas (AFs) diferentes (Figura 1), siendo las más abundantes y peligrosas la AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ y sus derivados metabólicos, la AFM₁ y AFM₂.

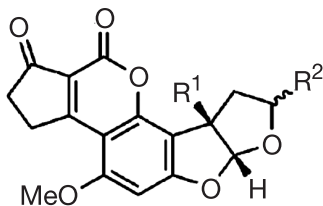


Aflatoxina B₁
Aflatoxina B₂

R = H
R = OH

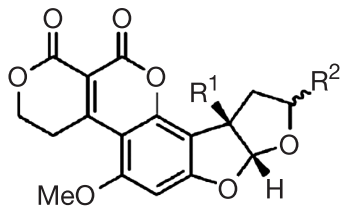


Aflatoxina G₁
Aflatoxina GM₁



Aflatoxina B₂
Aflatoxina M₂
Aflatoxina B_{2a}
Aflatoxina M_{2a}

R¹ = H
R¹ = OH
R¹ = H
R¹ = OH



Aflatoxina G₂
Aflatoxina GM₂
Aflatoxina G_{2a}
Aflatoxina GM_{2a}

Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas



Después de las AFs, el descubrimiento de nuevas micotoxinas creció de forma casi exponencial. Hoy en día ya hay descritos varios centenares de micotoxinas diferentes, aunque las micotoxinas consideradas como más importantes no llegan a una docena. En la Unión Europea, y para alimentación humana, en estos momentos solo se encuentran legisladas las AFs, la ocratoxina A (OTA), la zearalenona (ZEA), las fumonisinas (FBs), la patulina y, dentro del grupo de los tricotecenos, el deoxinivalenol (DON) y las toxinas T-2 y HT-2 (Figura 2).

No obstante, la situación es muy diferente en el ámbito de la alimentación animal. En este caso, a fecha de hoy, solo se encuentra regulado el nivel máximo de AFB1 en piensos y materias primas, y el nivel máximo de cornezuelo de centeno (*Claviceps purpurea*) en alimentación animal, este último caso un indicador indirecto de la posible existencia de alcaloides del ergot (Reglamento 574/2011 de la Comisión de 16 de junio de 2011 por el que se modifica el anexo I de la Directiva

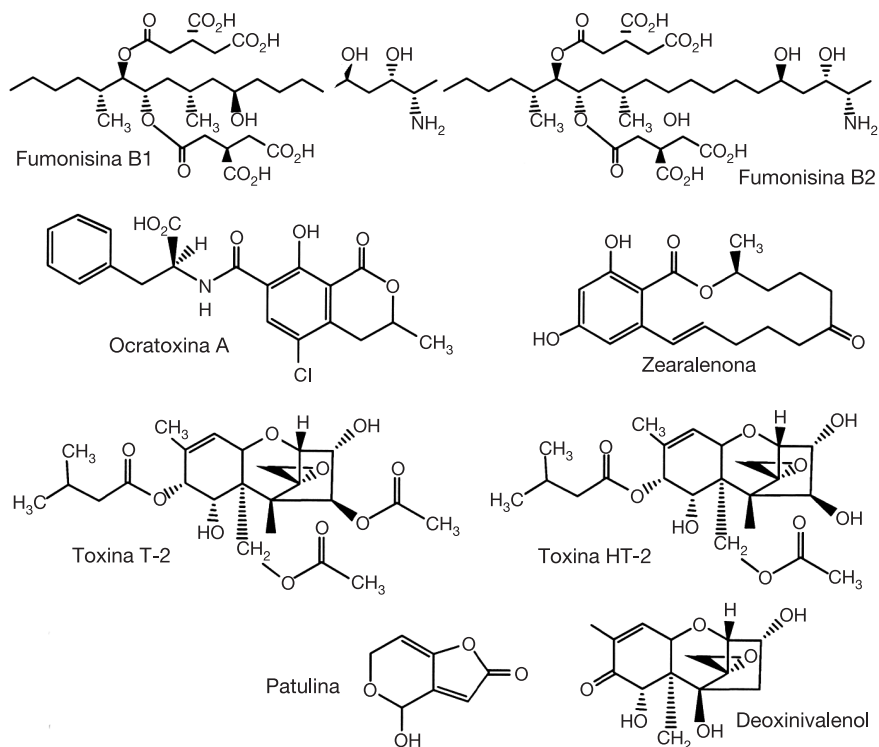


Figura 2. Estructura química de las principales micotoxinas



2002/32/CE). Para el resto de micotoxinas, solo existen Recomendaciones comunitarias (Recomendación 2006/576 sobre la presencia de DON, ZEA, OTA, T-2, HT-2 y FBs en productos destinados a la alimentación animal, Recomendación 2013/165 sobre la presencia de T-2 y HT-2 en cereales y derivados y Recomendación 2012/154 sobre el control de la presencia de alcaloides del cornezuelo en los piensos y los alimentos).

Los efectos tóxicos de las micotoxinas son muy variados y dependen de diferentes factores, como el tipo de micotoxina considerada, el nivel de contaminación en el pienso, la duración de la exposición a la misma, la especie animal, el sexo, edad y estado nutricional del animal, y la existencia de posibles efectos sinérgicos entre las micotoxinas coexistentes. Un listado no exhaustivo de los posibles síntomas incluiría: hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, carcinogénesis, problemas reproductivos, desórdenes gastrointestinales, nerviosos o respiratorios, inmunotoxicidad y problemas endocrinos, dependiendo de la micotoxina (Figura 3). Por regla general, la toxicidad subclínica suele conllevar inmunosupresión.

En cuanto a los criterios para el diagnóstico de una micotoxicosis animal, cabría incluir:

1. La enfermedad está ligada al consumo de pienso.
2. No se ha aislado ningún microorganismo significativamente patógeno.

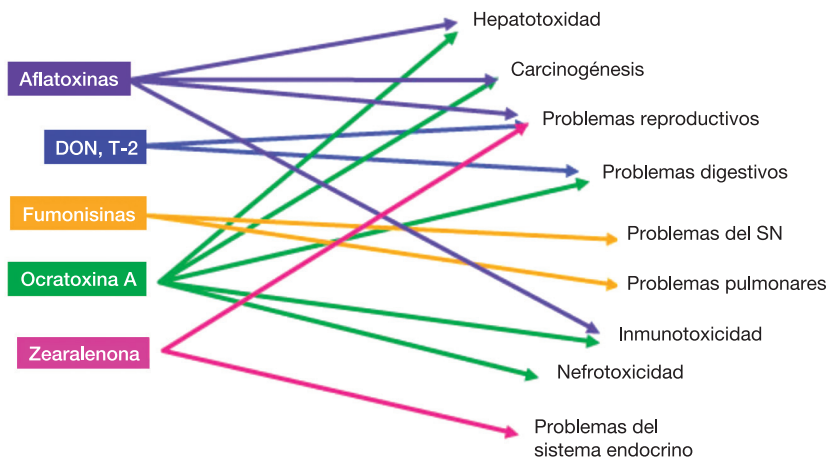


Figura 3. Principales efectos tóxicos de las micotoxinas



3. La enfermedad no es infecto-contagiosa.
4. Cuando se retira el alimento sospechoso el animal mejora.
5. Se aísla una micotoxina del alimento en cantidad suficiente como para causar una micotoxicosis.
6. Las micotoxinas aisladas producen los síntomas encontrados.
7. El pienso contaminado reproduce los síntomas cuando es suministrado a un animal sano.

Es conocida la gran frecuencia con la que se encuentran contaminadas las materias primas de origen vegetal con micotoxinas. Los cereales, y en especial el maíz, el trigo, la cebada y otros granos, así como los frutos secos, las especias, los zumos de frutas, y los alimentos derivados, incluyendo los piensos, suelen contener micotoxinas, siendo la norma la contaminación con más de una micotoxina diferente. En el caso de los piensos, micotoxinas producidas por especies del género *Fusarium* como el DON y las FBs suelen encontrarse en más del 50% de las muestras y, en muchos casos, el número de metabolitos fúngicos que se encuentran a la vez en un pienso supera la media docena (Figura 4). Es de destacar que entre estos metabolitos los últimos estudios indican la elevada frecuencia de micotoxinas emergentes, así como de las denominadas micotoxinas “conjugadas” o “enmascaradas”.

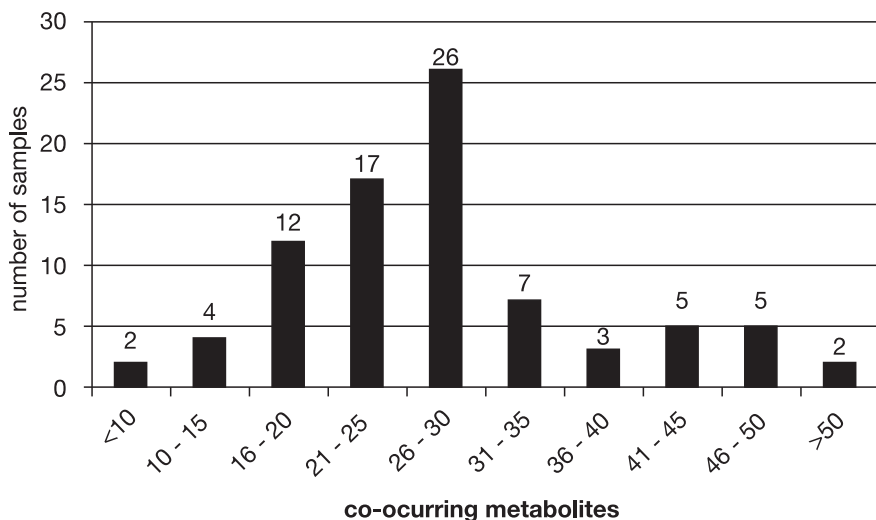
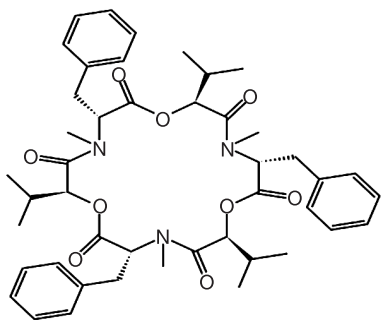


Figura 4. Distribución del número de metabolitos fúngicos encontrados en 83 muestras de piensos (según Streit, et al., 2013)

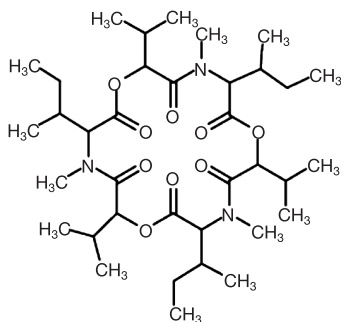


En cuanto a las micotoxinas emergentes, se trata de un conjunto de micotoxinas recientemente descubiertas, o cuya importancia se está reevaluando, producidas principalmente por especies de *Fusarium*, de las cuales aún se desconocen muchos datos sobre su presencia, niveles de contaminación y toxicidad, y entre las que destacan la beauvericina (BEA), las enniatinas (ENNs), la moniliformina (MON) y la fusaproliferina (FUS) (Figura 5).

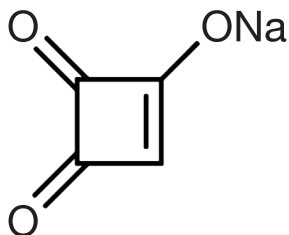
La BEA fue aislada por primera vez del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, aunque se ha descrito que puede ser producida por hasta 26 especies diferentes de *Fusarium*, incluyendo *Fusarium proliferatum* y *Fusarium verticillioides*. Por su parte, las ENNs son estructuralmente muy similares a la BEA, siendo las principales las enniatinas A, A1, B y B1, siendo producidas por hasta 18 especies diferentes de *Fusarium*. El principal sustrato en el que se han encontrado ambos grupos de toxinas son los cereales como el maíz, centeno, avena, cebada, trigo,



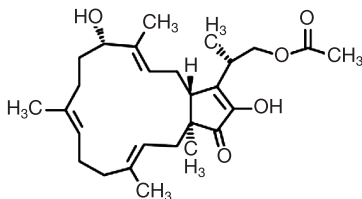
BEAUVERICINA



ENNIATINA A



MONILIFORMINA



FUSAPROLIFERINA

Figura 5. Micotoxinas emergentes



así como los piensos producidos a partir de ellos. La BEA y las ENNs presentan in vitro propiedades antimicrobianas, insecticidas, fitotóxicas y citotóxicas, pero su toxicidad in vivo aún ha sido poco estudiada.

La MON fue aislada por primera vez de una cepa de *Fusarium moniliforme* (posteriormente reclasificada como *F. proliferatum*), pero se ha descrito que puede ser producida por hasta 39 especies diferentes de *Fusarium*. Se ha encontrado principalmente en maíz, avena, cebada, trigo, centeno, arroz y piensos. Ha demostrado ser fitotóxica y citotóxica, pero no es mutagénica ni carcinógena, y se ha demostrado su toxicidad in vivo en múltiples casos. Los síntomas de intoxicación aguda incluyen: debilidad muscular, estrés respiratorio, degeneración del miocardio y lesiones en riñones, pulmones y páncreas, seguidas de coma y muerte. Por otra parte, la intoxicación crónica cursa, entre otros síntomas, con reducción del peso corporal, aumento del tamaño del corazón y riñones, lesiones en el miocardio, reducción de la producción de huevos, reducción del número de células sanguíneas y de la hemoglobina.

La FUS fue aislada por primera vez de una cepa de *F. proliferatum*, y se ha descrito que puede ser producida por hasta 8 especies diferentes de *Fusarium*. Se ha encontrado principalmente en maíz, centeno, avena, cebada, trigo y piensos. Ha demostrado ser fitotóxica, insecticida, citotóxica y teratogénica, y se ha descrito su capacidad para intercalarse en el DNA. Aunque existen muy pocos estudios de toxicidad in vivo, en embriones de pollo se ha visto macrocefalia, desarrollo anómalo de las extremidades inferiores, cabeza de tamaño desproporcionado, bicefalismo, desarrollo anormal de la región abdominal e, incluso, ausencia de cabeza.

Por último, en los últimos años se ha visto que algunas micotoxinas ya conocidas de antiguo están cobrando una importancia renovada, conociéndose ahora por ello como “micotoxinas re-emergentes”, entre las que se encuentran las toxinas producidas por *Alternaria spp.* (alternariol, alternariol monometil éter, ácido tenuazónico, AAL-toxinas, altertoxinas, tentoxina y altenueno) y el numeroso grupo de los alcaloides del ergot.

Por otra parte, el descubrimiento de las denominadas “micotoxinas conjugadas”, que son derivados de las micotoxinas principales, cuya estructura ha cambiado debido al metabolismo de la planta, del hongo, o del procesado de los alimentos, ha hecho reflexionar recientemente sobre la necesidad de reevaluar los niveles máximos de las micotoxinas legisladas. Cuando se realiza un análisis de micotoxinas en una muestra alimentaria, estas micotoxinas se escapan a menudo del



análisis, porque el cambio de su estructura molecular modifica sus características cromatográficas. Además, puede ocurrir que se modifique el epítipo reconocido por los anticuerpos para su detección o que se reduzca la eficacia del disolvente utilizado habitualmente para su extracción, al haber sufrido un cambio en su polaridad. Todo ello conduce al final a la subestimación del contenido total de micotoxinas en una muestra.

Actualmente no hay suficientes estudios sobre toxicidad, bioaccesibilidad y/o biodisponibilidad de las micotoxinas conjugadas, pero se asume que puede ser distinta de la de la toxina original. En algunos casos la molécula conjugada regenera la toxina original en el tracto gastrointestinal por acción de enzimas metabólicos (a nivel digestivo o en otros órganos) o de los microorganismos, lo que en la práctica supone que los seres humanos y los animales pueden estar ingiriendo mayores cantidades de toxinas de las que cabría esperar teniendo en cuenta los análisis estándar de micotoxinas habitualmente realizados.

En cuanto a la posibilidad de efectuar tratamientos detoxificadores a los alimentos contaminados con micotoxinas, en la actualidad el Reglamento 1881/2006 establece que los alimentos no pueden ser sometidos a detoxificación por métodos químicos, mientras que en el caso de la alimentación animal el Reglamento 386/2009 ha determinado un nuevo grupo funcional de aditivos para piensos cuya función es la de reducir la contaminación por micotoxinas mediante la reducción de su absorción, la promoción de su excreción, o la modificación de su modo de acción. El uso de estos compuestos, principalmente adsorbentes, no significa que se puedan utilizar piensos que excedan los niveles legales de micotoxinas. Por otra parte, hay que tener en cuenta que la utilización de estos adsorbentes de micotoxinas puede interferir en los resultados analíticos.

La única solución completa al reto de las micotoxinas será lograr el objetivo de eliminar a largo plazo las micotoxinas de la cadena alimentaria, a través de mejoras en los sistemas de prevención y control, junto con avances genéticos sobre la resistencia de las plantas a la infestación por mohos.

Agradecimientos

A.J. Ramos agradece la ayuda prestada por el Ministerio de Economía y Competitividad a través de los proyectos AGL2014-55379-P y RTC-2015-3508-2 (Proyecto cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional-FEDER).



Bibliografía

Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, S.D., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G., and Stroka, J. 2013. Masked mycotoxins: a review. *Molecular Nutrition and Food Research* 57: 165-186.

Galaverna, G., Dallsta, C., Mangia, M.A., Dossena, A., and Marchelli, R. 2009. Masked mycotoxins: an emerging issue for food safety. *Czech Journal of Food Sciences* 27: S89-S92.

Marín, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., and Sanchis, V. 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 60: 218-237.

Ramos, A.J. (Ed.). 2011. *Micotoxinas y micotoxicosis*. A. Madrid Vicente Ediciones, Madrid.

Stoev, S.D. 2015. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39: 794-809.

Streit, E., Schwab, C., Sulyok, M., Naehrer, K., Krska, R., and Schatzmayr, G. 2013. Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins* 5: 504-523.

Tedjiotsop Feudjio, F., Dornetshuber, R., Lemmens, M., Hoffmann, O., Lemmens-Gruber, R., and Berger, W. 2010. Beauvericin and enniatin: emerging toxins and/or remedies? *World Mycotoxin Journal* 3: 415-430.



NUEVAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE LINFOMA Y LEUCEMIA EN PEQUEÑOS ANIMALES

Dr. Antonio Meléndez Lazo

Servicio de Hematología Clínica Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona

Las enfermedades linfoproliferativas en perros y gatos son patologías frecuentes en la clínica de pequeños animales y a menudo suponen un importante reto diagnóstico mediante el empleo de técnicas habituales como la citología, en el caso del linfoma, o el hemograma con examen del frotis sanguíneo en el caso de la leucemia linfocítica. También suponen un gran reto clínico por la variedad de signos clínicos y respuesta a tratamiento que presentan los pacientes con estas patologías.

Actualmente el diagnóstico del linfoma canino y felino recae sobre el examen citológico y, especialmente, sobre la escisión quirúrgica de un linfonodo afectado y su examen histológico, junto al empleo de técnicas de inmunohistoquímica para determinar el inmunofenotipo y establecer un pronóstico lo más acertado posible.

Cada vez son más frecuentes los estudios en los que se emplean técnicas menos invasivas que consiguen una elevada sensibilidad y especificidad para predecir el comportamiento de linfomas y leucemias, y así establecer un pronóstico y un tratamiento adecuados en cada caso.

Estas técnicas son principalmente el inmunofenotipaje mediante citometría de flujo y PARR (PCR for Antigen Receptor Rearrangement o PCR del reordenamiento del receptor de antígeno). Ambas técnicas presentan sus ventajas y limitaciones, pero han demostrado ser de gran utilidad en aspectos como:

- El diagnóstico de enfermedades linfoproliferativas (de especial importancia en caso de citologías dudosas o linfomas/leucemias de células pequeñas).
- El pronóstico de estas patologías.
- La detección precoz de recidivas en animales con linfoma en remisión.
- La detección de enfermedad mínima residual.
- La diferenciación entre procesos reactivos vs. neoplásicos.

Citometría de flujo

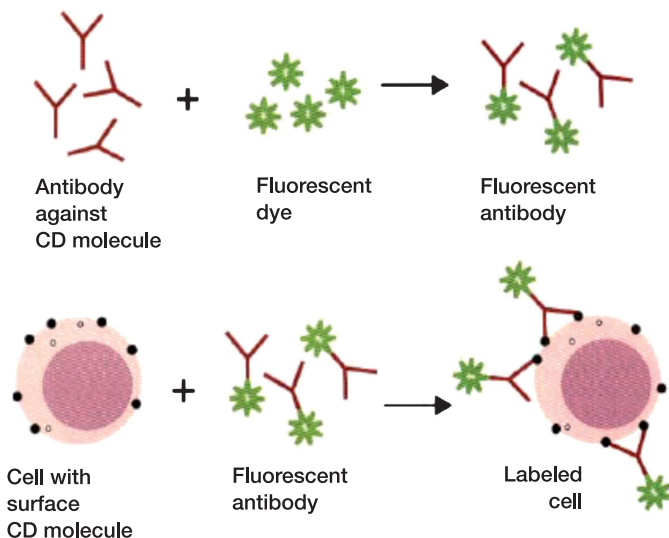
El inmunofenotipaje mediante citometría de flujo se basa en el empleo de diferentes paneles de anticuerpos que se unen a antígenos de membrana o intracelu-



lares de células linfoides en suspensión. Estos anticuerpos emiten fluorescencia que es detectada por los distintos componentes del citómetro de flujo y permite una amplia caracterización de las células analizadas.

Los linfocitos neoplásicos suelen perder ciertos marcadores que caracterizan a los mismos tipos de linfocitos no neoplásicos o pueden expresar marcadores inapropiados para su nivel de diferenciación o el tipo celular que representan. En la actualidad existen una gran variedad de anticuerpos que se emplean para caracterizar los distintos tipos celulares en perro y gato:

Marcadores celulares de superficie de uso común detectados por citometría de flujo en perro y gato		
Marcador	Tipo celular	Notas
CD1	Células dendríticas	También algunas subpoblaciones de células B y monocitos
CD3	Células T	
CD4	Células T helper	Neutrófilos en perro. Monocitos, macrófagos y células dendríticas pueden expresar CD4
CD4/CD8 doble positivo	Timocitos	
CD5	Células T	En algunas especies también en algunas células B
CD8	Células T citotóxicas	También una subpoblación de células Natural Killer
CD14	Monocitos	También en algunos tipos de macrófagos
CD18	Todos los leucocitos	Mayor expresión en granulocitos y monocitos que en linfocitos
CD21, CD22	Células B maduras	Ausente en células plasmáticas
CD34	Células hematopoyéticas inmaduras (excepto eritroides)	Presente en las células de algunos casos de leucemia aguda de origen linfóide o mieloide
CD45	Todas las células hematopoyéticas (excepto eritroides)	
CD79a o CD79b	Células B en todos los estadios	Antígeno intracelular. Ausente en células plasmáticas
MHC II	Células presentadoras de antígenos, la mayoría de linfocitos	MHC II = Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
IgM de superficie	Células B inmaduras	Ig = Inmunoglobulina
Cadena ligera	Células B y células plasmáticas productoras de anticuerpos	Mayor expresión de cadena ligera- λ que cadena ligera- κ en perros y gatos con procesos benignos y neoplásicos



Algunos fenotipos, patrones de expresión, o marcadores específicos son de especial utilidad para el diagnóstico o pronóstico.

Muestra:

Para poder procesar las células en el citómetro de flujo es necesario que estén en suspensión. Las muestras de sangre, efusiones o líquido cefalorraquídeo en tubos con EDTA son fácilmente procesables aunque la estabilidad de las células es limitada (máximo 72 horas en refrigeración). Para el inmunofenotipaje de masas u órganos sólidos es necesario hacer aspirados con aguja fina y depositarlos en suero salino fisiológico, añadiendo suero del propio paciente o suero fetal bovino para prolongar la viabilidad de las células lo máximo posible. En la actualidad existen algunos preparados comerciales que contienen bajas concentraciones de formol y pueden prolongar la estabilidad de las células, aunque algunos marcadores pueden verse afectados por el uso de estos compuestos.

En general, se ha de consultar con el laboratorio al que se remite la muestra las condiciones específicas de conservación y los requisitos que deben cumplir, aunque lo ideal es enviar la muestra lo antes posible y que la muestra sea de suficiente celularidad (al menos 2 millones de células para que pueda aplicarse un panel completo de anticuerpos y optimizar el inmunofenotipaje). No se recomienda mezclar muestras de distintos órganos (ej. linfonodos) y no se debe congelar la muestra.



PARR

PARR es una técnica de diagnóstico molecular que se basa en la detección de clones de un mismo tipo de linfocito. Como parte de su desarrollo, los linfocitos sufren un reordenamiento de los genes que codifican para el receptor de células T (TCR), mientras que las células B sufren un reordenamiento de los genes que codifican en receptor de inmunoglobulinas (Ig). El resultado es que todos los linfocitos tienen una ligera diferencia en su TCR o receptor de Ig. Sin embargo, pequeños fragmentos del ADN que codifican para cada receptor son similares en todos los linfocitos, y permiten la utilización de primers que amplifican la mayoría de los receptores y dan lugar a productos de PCR que varían ligeramente en tamaño y composición. Por lo tanto, PARR de tejido linfoide benigno detectará gran variedad de productos de PCR que representan la diversidad de los receptores benignos. Como la transformación neoplásica de los linfocitos se produce normalmente después de que estas células hayan sufrido el reordenamiento de los receptores, las células descendientes malignas tendrán el mismo gen receptor de antígeno, que es detectado por PCR como un único producto que representa una población monoclonal. De forma ocasional, se pueden detectar poblaciones neoplásicas biclonales o triclonales.

Una de las ventajas de PARR es su capacidad para detectar procesos neoplásicos dentro de procesos reactivos, como puede ocurrir en caso de un linfoma temprano, formándose entre una población de linfocitos reactivos.

Precauciones:

PARR tiene el potencial de ser muy sensible y específico; sin embargo, se producen falsos positivos y falsos negativos por distintas razones. Aunque los linfocitos neoplásicos tienen origen clonal, no todas las poblaciones clonales de linfocitos son neoplásicas, ya que algunas enfermedades inflamatorias e infecciosas, como la ehrlichiosis crónica, la anaplasmosis o la enfermedad de Lyme pueden dar lugar a expansiones clonales de linfocitos (falsos positivos). Los falsos negativos suelen ser debidos a muestras poco celulares. Además, PARR es menos sensible en gatos que en perros. En perros detecta entre un 75 y un 80% de casos confirmados de linfoma o leucemia linfocítica. En gatos, los protocolos disponibles detectan entre un 60 y un 65% de muestras con linfocitos neoplásicos. Aunque un resultado positivo es altamente sugestivo de linfoma, un resultado negativo en cualquiera de las dos especies no descarta linfoma.



Muestra:

El ADN para PCR se puede obtener de sangre, muestras fluidas, preparaciones citológicas secas y teñidas y preparaciones histológicas o fragmentos de tejido. El número mínimo de células recomendado es aproximadamente de 50 mil. Una característica importante de esta técnica es que las preparaciones pueden ser examinadas al microscopio y después enviadas para recuperar las células, extraer el ADN y hacer PCR. Este proceso facilita el diagnóstico clínico porque garantiza que las células en cuestión están presentes en la preparación en un número adecuado. Además, las células se pueden conservar mientras los propietarios consideran pruebas o tratamientos adicionales. Los fluidos y la sangre se deben enviar de manera rápida, refrigeradas pero no congeladas, al laboratorio donde realizan PARR.

Debido a la falta de estandarización del método entre laboratorios (ej. diferentes primers) lo mejor es contactar con cada laboratorio para informarse sobre los tipos de muestra aceptadas y las características de la interpretación (sobre todo especificidad y sensibilidad del test en ese laboratorio).

Bibliografía

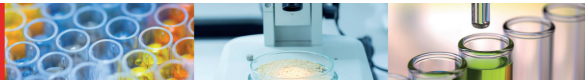
Burkhard M.J., Bienzle D. Making sense of lymphoma diagnostics in small animal patients. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2013;1331-47.

Comazzi S., Gelain M.E., Martini V., et al. Immunophenotype predicts survival time in dogs with chronic lymphocytic leukemia. *J Vet Intern Med* 2011;25:100-6.

Sözmen M., Tasca S., Carli E., et al. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 2005;17:323-9.

Wilkerson M.J., Dolce K., Koopman T., et al. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;106:179-96.

Burnett R.C., Vernau W., Modiano J.F., et al. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol* 2003;40:32-41.



EXPLORACIÓN LABORATORIAL RENAL Y HEPÁTICA

Dr. Mariano J. Morales Amella

Director de Laboratorios Albéitar

Profesor Asociado Patología Animal. Facultad de Veterinaria de Zaragoza

Pruebas laboratoriales que exploran la función renal

La unidad funcional del riñón es la nefrona, formada por el glomérulo, que contiene un lecho vascular, donde se produce la filtración de la sangre, y por los túbulos encargados de la modificación del filtrado.

El producto final de estos procesos de filtración y modificación del filtrado es la orina.

La exploración de la función renal mediante pruebas en el laboratorio tiene por objetivo conocer la naturaleza y extensión de la enfermedad renal y establecer un pronóstico.

Conceptos importantes

La *azotemia* se define como una concentración aumentada en sangre de componentes nitrogenados no proteicos: urea y creatinina.

- La azotemia prerrenal es una consecuencia de la perfusión renal reducida (p. ej. deshidratación grave, fallo cardíaco).
- La azotemia postrenal resulta de la interferencia en la excreción de orina desde el cuerpo. (p. ej. obstrucción, uroabdomen).
- La azotemia renal primaria está causada por una enfermedad renal del parénquima.

El *fallo renal* se refiere a un síndrome clínico que ocurre cuando los riñones no son capaces de mantener su función. El fallo renal ocurre cuando más del 75% de nefronas no funcionan.

La *uremia* se refiere a los signos clínicos y alteraciones de la bioquímica.

La *enfermedad renal* se refiere a la presencia de lesiones morfológicas o funcionales en uno o ambos riñones (ecografía, rayos, TAC).



Análisis de orina

El urianálisis:

Es una prueba simple y barata.

No solo es útil en la evaluación de los pacientes con enfermedad del tracto urinario, sino que también con enfermedades sistémicas que afectan a otros órganos.

Los resultados de los análisis de orina seriados pueden reflejar la progresión o remisión de una enfermedad.

El análisis de orina consta de tres partes: propiedades físicas, químicas y el sedimento urinario.

Propiedades químicas

Los parámetros que se pueden determinar en la tira reactiva más importantes son:

Hematíes

En perros y gatos normales la reacción será siempre negativa.

Una reacción positiva se debe con mayor frecuencia a la presencia de eritrocitos en la orina (hematuria).

- Una densidad alta causará crenación de los hematíes.
- Una densidad baja causará hinchamiento y lisis de los hematíes.

La reacción de sangre se vuelve positiva antes que la hematuria se observe macroscópicamente.

- Una reacción positiva a este test debe ser interpretada junto a la observación microscópica del sedimento urinario y el color del suero.
- Si el suero del paciente es de color rosa hay hemólisis, pero si el suero es claro hay rabdomiolisis.
- Con este test no es posible diferenciar entre hemoglobinuria y mioglobinuria.



Glucosa

La glucosa en orina se puede detectar utilizando la tira de orina. Cuando el nivel de glucosa en sangre supera la capacidad de reabsorción de los túbulos renales (300 mg/dl) la glucosa aparece en orina. Esto se ve típicamente en pacientes con diabetes mellitus pero también puede ocurrir con estrés (sobre todo en los gatos), administración de fluidos con glucosa.

Bilirrubinuria

En los gatos, la presencia de bilirrubinuria siempre es patológica. En perros, pequeñas cantidades de bilirrubina en orina pueden ser normales.

Proteínas

El origen de la proteinuria debe ser localizado (riñón, uréter, vejiga, uretra, tracto genital). Siempre hay que considerar la historia clínica, hallazgos del examen físico y evaluación del sedimento urinario.

No influye el método de extracción de la orina (micción espontánea, cateterización o punción vesical).

La concentración de proteínas en la orina se puede determinar:

- Por métodos semicuantitativos (tira de orina).
- Cuantitativos.
- Electroforesis (si hay proteinuria).

Tipos de proteinuria

Cuando se detecta proteinuria en un animal es importante determinar si esta es de origen prerrenal, renal o postrenal.

- La proteinuria prerrenal se da en situaciones donde hay cantidades anormales de proteína en plasma y estas se filtran en los glomérulos (p.ej. hemoglobina, mioglobina o inmunoglobulinas).
- La proteinuria postrenal se origina en el tracto urinario inferior (vejiga o uretra) o tracto reproductor cuando hay un proceso inflamatorio. Estos animales tendrán un sedimento activo en la orina y sintomatología asociada.



- La proteinuria renal implica que el riñón es el origen de la proteinuria. Esto se puede deber a un proceso inflamatorio, en este caso de origen renal (p.ej. pielonefritis o necrosis tubular), y que suele ir también asociada a sintomatología clínica y sedimento activo. También puede deberse a un proceso no inflamatorio. Cuando el sedimento no es activo, y se ha descartado la posibilidad de proteinuria prerrenal, es probable que esta sea entonces de origen glomerular o tubular.

Para cuantificar con exactitud la cantidad de proteína que el animal pierde por orina haría falta recoger la orina producida durante 24 horas y medir la proteína en este volumen. Como esto no es práctico, se mide la relación entre la cantidad de proteína y creatinina excretadas en una muestra de orina (cociente proteína: creatinina en orina UP/C). Se ha demostrado que este método da valores similares a la excreción de proteína en 24 horas.

El método de recogida de la orina no influye en la medición del UP/C.

Se considera normal un cociente proteína: creatinina < 0.4 en gatos y < 0.5 en perros. Las enfermedades glomerulares suelen cursar con proteinuria severa (cocientes proteína: creatinina ≥ 2.0). Las enfermedades tubulares suelen causar proteinuria más leve (generalmente ≤ 2.0). Es también importante documentar la persistencia de la proteinuria. Para esto se debe de medir y encontrarse elevada en tres ocasiones en un periodo de dos semanas. Esto se hace para descartar la proteinuria renal funcional, que es leve y transitoria.

Valores de referencia de Proteinuria (UP/C) para asignar la subclasificación del IRIS para la enfermedad renal crónica en perros y gatos

Ratio proteinuria/creatinina	CLASIFICACIÓN
< 0.2 perros	NO PROTEINÚRICO
< 0.2 gatos	
$0.2-0.5$ perros	LÍMITE DE PROTEINURIA
$0.2-0.4$ gatos	
> 0.5 perros	PROTEINURIA
> 0.4 gatos	



Pruebas físicas

La densidad específica de orina (DEO/DU)

La densidad de orina es una manera sencilla de evaluar la función renal y la capacidad de los túbulos renales para conservar o excretar agua, dependiendo de las necesidades. Se mide utilizando un refractómetro, el cual da una medida aproximada de la concentración total de solutos en la orina.

La DU debe ser determinada antes de un tratamiento con fluidos, diuréticos, corticosteroides, antibióticos u otros medicamentos.

La primera orina de la mañana es más probable que tenga una concentración más alta de solutos.

La orina de la primera hora de la mañana debe tener una $DU > 1.035$ en gatos que consumen comida seca y > 1.025 los que consumen comida húmeda y en los perros > 1.030 - 1.040 .

Los perros y gatos deshidratados deben elaborar orina concentrada > 1.040 si el eje hipotalámico-pituitaria-adrenal-renal es normal.

Diagnóstico más precoz que la creatinina, la DU se ve alterada cuando un 60-67% de nefronas se vuelven no funcionales.

Se requiere 1/3 de nefronas funcionales para concentrar la orina, por lo que una $DU > 1.030$ no descarta la posibilidad de patología renal.

La DEO nos puede ayudar a verificar la presencia de poliuria y, en algunos casos, establecer el estado de hidratación del paciente.

Un animal sano puede tener una DU entre 1.001 y > 1.050 ; es importante recordar que la DU se debe interpretar junto con la analítica y la historia clínica del animal (previa administración de fluidos, diuréticos, glucocorticoides, etc.).

Una $DU > 1.035$: estos valores indican que los riñones retienen la capacidad de concentrar orina y por lo tanto elimina la posibilidad de insuficiencia renal. Si el paciente se presenta con azotemia, se deben investigar causas prerrenales (deshidratación, hipovolemia, etc.). Es importante recordar que se requiere al menos 1/3 de nefronas funcionales para concentrar orina; por lo tanto $DEO > 1.030$ no descarta la posibilidad de patología renal.



Una DU 1.013-1.030 en el perro y de 1.013-1.035 en el gato: función tubular parcialmente preservada. Puede verse en animales sanos y en animales con enfermedad renal deshidratados. Si el animal se presenta con azotemia, estos valores indican una capacidad de concentración de orina inadecuada. Si es persistente y no hay otras causas hay que considerar una posible enfermedad renal.

Una DU 1.008-1.012: la producción de orina de esta densidad implica total falta de conservación de agua en los túbulos renales. En combinación con azotemia, el animal sufre insuficiencia renal. Pueden interferir con la capacidad de concentración renal la diabetes, los glucocorticoides, diuréticos, hipercalcemia, etc. Si es persistente, sugiere disfunción tubular.

Una DU < 1.008: esto implica que los túbulos renales son funcionales (puesto que están activamente diluyendo el filtrado glomerular) y, por lo tanto, descarta la posibilidad de insuficiencia renal. Esto lo vemos en situaciones en las que hay alguna interferencia con la acción de la ADH en los túbulos colectores (por ejemplo, en casos de lavado medular de solutos o diabetes insípida, sea central o nefrogénica).

El sedimento urinario

Realizar el estudio del sedimento con orina fresca, porque los cilindros y elementos celulares se degeneran a temperatura ambiente (no más de 24 horas). Tener en cuenta el método de obtención sobre todo para el estudio microbiológico.

Se centrifuga 5-10 ml entre 1.000-1.500 rpm durante 5 minutos.

Colocar una gota del sedimento (no del sobrenadante) en el portaobjetos.

El número de cilindros es calculado por el objetivo de 10x, los hematíes, leucocitos y células por el objetivo de 40x.

Morfología bacteriana tinción de Gram a 100x

	Micción	Sonda	Cistocentesis
Hematíes	0-8	0-5	0-3
Leucocitos	0-8	0-5	0-3
Bacterias/ml	< 10 ⁵	< 10 ⁴ perros machos, cualquier n° hembras	< 10 ³
(Contaminación)		< 10 ⁴ gatos	



Pruebas bioquímicas que miden la funcionalidad renal

Las pruebas bioquímicas que exploran la función renal incluyen la determinación de urea y creatinina que son indicadores de la capacidad renal de filtración. Evaluaciones repetidas de ambas, son útiles para comprobar la eficacia del tratamiento y la progresión de la enfermedad.

Para poder relacionar la azotemia con un fallo de la función glomerular es necesario conocer cómo se producen y eliminan ambas sustancias.

La existencia de azotemia implica una disminución del RFG, el cual depende de:

- a) Factores prerrenales (presión y volumen sanguíneo, presión osmótica coloidal).
- b) Factores renales (funcionalidad de arterias y capilares glomerulares).
- c) Factores postrenales (vías urinarias).

Debido a ello, la azotemia se puede clasificar en azotemia prerrenal, renal o postrenal.

La urea

La urea se sintetiza en el hígado a partir del amoníaco.

La urea se filtra ligeramente en el glomérulo pero también se reabsorbe por el túbulo colector bajo el efecto de la hormona antidiurética.

Una concentración de urea por encima de 40 mg/dl puede existir 4-8 horas después de comer un alimento, y especialmente rico en proteínas.

Se recomienda unas 8-12 horas de ayuno.

La producción y excreción de la urea no es constante.

La urea disminuye con insuficiencia hepática severa, shunt portosistémico.

El sangrado gastrointestinal, fiebre, inanición e infecciones pueden aumentar la concentración de urea.

Medicamentos que aumentan el catabolismo tisular (glucocorticoides, aztriopina, tetraciclinas).



La creatinina

La creatinina es el biomarcador más adecuado para estimar la filtración glomerular (TFG), se produce en el cuerpo a un ritmo constante como producto de la degradación de fosfocreatina en el músculo, se filtra libremente en el glomérulo y NO se reabsorbe por los túbulos renales.

La relación entre la creatinina y la TFG es exponencial, la creatinina se duplica cuando la TFG se reduce a la mitad, no llegando a superar el rango de referencia hasta que la TFG disminuya un 75%, lo que limita su uso como marcador biológico para la enfermedad renal precoz.

Los cachorros de 1-16 semanas suelen tener valores de 0.4-0.5 mg/dl.

En gatos y perros, el animal debe estar bien hidratado y en ayunas, realizar repeticiones seriadas (en el perro variaciones de 0.3-0.4 mg/dl puede ser significativo).

Consideraciones

Una concentración normal de urea y creatinina sérica no implica necesariamente una función renal normal.

Una concentración normal de urea y creatinina implica que al menos un 25% de la masa renal es funcional, pero la cantidad exacta de masa renal funcional no puede ser determinada por estas determinaciones.

En algunas circunstancias las concentraciones de urea y creatinina están aumentadas, pero no ambas al mismo tiempo.

Aumento desproporcionado de urea en relación a la creatinina	Aumento desproporcionado de la creatinina en relación a la urea
Deshidratación grave y depleción del volumen	Enfermedad hepática
Hemorragia intestinal	Anorexia o dieta baja en proteínas
Animal raquítico	Lesión muscular masiva
Animal joven	Debilidad muscular individual



Fósforo

Marcador endógeno del filtrado glomerular.

La concentración de fósforo sérico no aumenta hasta que > del 85% de las nefronas no son funcionales.

El fósforo es filtrado por el glomérulo y reabsorbido por los túbulos.

Valores normales de fósforo 2.5-5 mg/dl.

Los niveles altos de fósforo estimulan de manera indirecta la secreción de hormona paratiroidea (PTH).

La PTH estimula la excreción de fósforo en la orina y la reabsorción de calcio a nivel renal, óseo e intestinal. El aumento de las concentraciones de PTH se ven además favorecidas por la reducción en la síntesis de calcitriol.

La hiperfosfatemia parece ser factor de riesgo en la progresión de la enfermedad renal en gatos.

Potasio

Puede estar aumentado en casos de oliguria/anuria o urobacteriemia o reducido en algunos casos de enfermedad renal crónica. Cuando se encuentra aumentado, debemos descartar la posibilidad de obstrucción urinaria (azotemia post-renal) o anuria por insuficiencia renal aguda.

Biomarcadores renales

En 2009, la (FDA) y (EMA) aprobó el uso de algunos de estos biomarcadores urinarios para la detección de la IRA en el contexto del desarrollo de fármacos:

- Gamma glutamil transpeptidasa.
- La proteína total urinaria (UTP).
- (KIM-1).
- Clusterina.
- B2-microglobulina (B2M).
- Cistatina-C.



- N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG).
- NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos.
- Enzima lisosomal túbulo proximal.

Gamma glutamil transpeptidasa: se ha demostrado que en perros con lesión renal aguda por el uso de la gentamicina la GGT en orina aumenta antes que los niveles de creatinina (día 1 comparado con día 7). Parece ser un marcador sensible del daño renal pero las muestras han de ser analizadas inmediatamente y no es una prueba comercializada. Por ello, su uso no es práctico en la clínica.

N-acetil- β -glucosaminidasa: es una enzima presente en lisosomas de los túbulos proximales. Su concentración en orina está aumentada en personas con daño renal agudo y precede a los aumentos en creatinina.

α 1 y β 2 microglobulinas: la β 2 microglobulina es una proteína que se filtra en el glomérulo y se reabsorbe en el túbulo proximal. Su concentración en orina aumenta con el daño renal y precede al aumento en la creatinina. El problema es que no es estable en orina y por lo tanto su medición no es práctica para uso clínico.

La α 1 microglobulina es más estable pero menos específica y está aumentada en otras condiciones patológicas como la enfermedad hepática.

Proteína de unión al retinol: se sintetiza en el hígado, se filtra en el glomérulo y se reabsorbe en los túbulos proximales. Se ha evaluado en perras con piometra como marcador de enfermedad tubular y se ha encontrado que está significativamente aumentada en orina comparado con perros sanos.

Cistatina C: la cistatina C es una proteína de baja masa molar cuyo estudio ha despertado un interés creciente desde el año 1985 cuando Simonsen y cols. demostraron que su concentración en suero humano presentaba una correlación negativa con la tasa de filtrado glomerular. La cistatina C se filtra en el glomérulo y se reabsorbe en los túbulos proximales.

En dos estudios publicados recientemente, la cistatina C fue capaz de señalar la presencia de lesión renal en perros con leishmaniosis, tanto en un grupo de animales con azotemia, como en un grupo de perros con alteraciones en el proteinograma indicativas de una lesión renal, pero sin azotemia. La cistatina C también fue capaz de diferenciar a los animales que tenían una lesión renal del resto de la población, incluyendo a los perros con leishmaniosis que parecían presentar



daño renal aunque no eran azotémicos. Además, las correlaciones que mostró la cistatina C con otros biomarcadores en los animales con enfermedad renal indicaban que la concentración sérica de la cistatina C aumentaba conforme se agravaba la lesión glomerular.

(NGAL) Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos: es una enzima que inicialmente se encontró asociada a neutrófilos pero ahora se sabe que es expresada por células epiteliales. Su expresión aumenta marcadamente en las primeras horas de la lesión renal aguda tanto en humana como en perros (nefrotoxicidad, isquemia, procesos obstructivos).

Un estudio reciente (J Vet Intern Med 2014; 28:437-442) demostró que los perros con enfermedad renal crónica tienen valores de NGAL sérica y en orina superiores a perros sanos. Además, los valores de NGAL séricos tenían un valor predictivo mayor que la creatinina sérica.

La conclusión de diferentes estudios es que el NGAL en orina es un marcador de fallo renal agudo y se puede utilizar en casos donde se sospecha al daño renal inminente pero cuando todavía no se ha desarrollado azotemia (por ejemplo, en estadios tempranos de nefrotoxicidad).

U-clusterina: clusterina urinaria (U-clusterina) ha sido aprobado como un biomarcador para controlar la lesión tubular proximal inducida por fármacos en las ratas por la (FDA) y (EMA). La U-clusterina es una glicoproteína 10 que se compone de 2 subunidades de 40 kD (NA1, NA2) unido por grupos disulfuro. Las funciones atribuidas a clusterina incluyen la protección de las células al estrés, el transporte de lípidos, tiene un papel antiapoptótico, la protección de la función celular en la enfermedad renal específica, y estar involucrado en la regulación de la actividad del complemento. En un trabajo publicado en el Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (2012, 24(2): 301–306) comprueban que la concentración de U-clusterina era capaz de distinguir en perros con leishmaniosis sin daño renal y los perros con insuficiencia renal según el esquema de IRIS y es más sensible que la UPC para detectar daño renal.

Exploración laboratorial en la patología hepática

Aproximadamente uno de cada 100 perros o gatos que acuden enfermos a la clínica lo hacen con algún problema hepático de tipo primario o secundario. El diagnóstico de las hepatopatías, especialmente de curso crónico, se lleva a cabo, en muchos casos, de forma accidental cuando se realiza un perfil bioquímico san-



guíneo, con pruebas que exploran el hígado, a animales aparentemente sanos o con patologías extrahepáticas que no afectan secundariamente al hígado.

Indicaciones

La finalidad de las pruebas laboratoriales para explorar el hígado se llevan a cabo para:

- Establecer la presencia/ausencia de enfermedad hepatobiliar.
- Diferenciar los tipos de ictericia.
- Definir el tipo de enfermedad hepatobiliar.
- Conocer las alteraciones funcionales del hígado, una vez diagnosticada la hepatopatía.
- Establecer el pronóstico y eficacia de tratamiento.

Limitaciones

Debido a la elevada capacidad de regeneración y reserva funcional del hígado, la baja sensibilidad de muchas pruebas funcionales no permite diferenciar si la enfermedad hepática es primaria o secundaria. En determinados casos no es posible establecer el tipo de afección hepática. Las pruebas funcionales pueden alterarse por patologías extrahepáticas.

Enzimas

La determinación de la actividad de ciertos enzimas, en suero / plasma, se incluye en los perfiles bioquímicos que se realizan para detectar la presencia / ausencia de enfermedad hepática.

Localización de las enzimas:

Citoplasmáticas: son solubles y se liberan fácilmente pasando a través de la membrana celular, aunque no se encuentre morfológicamente alterada; por ello son indicadores de daño leve en la célula. ALT, CPK, LDH.

Mitocondrial: suelen aparecer en sangre tras un daño severo, pues ya deben atravesar dos o más membranas. ALT.

Enzimas unidas a membranas: no son solubles y están unidas firmemente a la membrana celular. Aunque pueden liberarse tras un daño muy severo, su aparición en sangre suele ser por una estimulación de síntesis. Por ejemplo, en colestasis, corticoides, fármacos. ALP, GGT.



Conservación de las enzimas:

Durante 3 días a 4°C no existe pérdida de la actividad enzimática.

Más de tres días hay que congelar a -20°C y puede haber variaciones:

- Enzimas con un porcentaje de variación inferior al 10%: AST y lipasa.
- Enzimas entre un 10% y 20%: ALT, CK, LDH, AMILASA Y ALP.
- Enzimas de variación superior al 20%: GGT.

La hemólisis y la lipemia interfieren.

ALT-GPT (alanito aminotransferasa)

Se encuentra, en niveles altos, en el parénquima hepático y, en escasa cantidad, en el resto de tejidos del perro y del gato.

Debido a su localización en el citoplasma celular, cualquier alteración en la membrana del hepatocito que produzca un aumento de la permeabilidad va a dar lugar a incrementos en el plasma.

Estos incrementos pueden ser:

Hemólisis Daño muscular	– El daño puede producir aumentos leves no más de 2 o 3 veces su valor basal
Anticonvulsivos, corticoides	– Llegando a valores de 4-10 veces el valor basal
Daño hepatocelular	– Los aumentos pueden llegar a 100 veces – La actividad de la ALT solo va a indicar la existencia de daño en el hepatocito

GOT (aspartato aminotransferasa)

La AST (aspartato-aminotransferasa) es una enzima muy sensible pero muy poco específica a la hora de determinar disfunciones hepáticas.

Su sensibilidad es alta debido a que es una enzima que se localiza en el citosol y las mitocondrias de las células, por lo que una elevación puede indicar una lisis completa del hepatocito.



Las elevaciones de AST suelen ir asociadas a las de ALT en alteraciones del hígado.

En el gato es un parámetro bastante fiable a la hora de detectar problemas hepáticos.

Sin embargo, no es un marcador hepático muy específico, ya que se encuentra en considerables cantidades en el músculo estriado y cardíaco.

También se eleva con corticosteroides y fenobarbital.

La vida media y evolución de ALT y AST son diferentes:

	ALT	AST
Vida media	2-3 días en el perro	½ día en el perro
	3.5 horas en el gato	1.5 horas en el gato
Nivel máximo de actividad	1-2 días	1-2 días
Declinación de actividad	2-3 semanas	2-3 semanas

FAS/ALP (fosfatasa alcalina)

Es una enzima asociada a las membranas celulares, presente en hueso, hígado, intestino, riñón y placenta. Aunque estos órganos contienen concentraciones importantes de esta enzima, la fosfatasa alcalina presente en suero procede de:

- Gato: hígado.
- Perro: hueso, hígado.

El hígado del perro sintetiza dos tipos de enzimas de las FAS: fracción hepática y fracción inducida por corticosteroides.

La actividad de FAS en animales jóvenes en crecimiento es mayor debido a la presencia de FAS ósea procedente de los osteoblastos.

Aumento de la actividad en suero / plasma:

- Hallazgo frecuente en perros muy enfermos.
- En enfermedades óseas está aumentada 2-3 veces los valores de referencia.
- En enfermedades hepatobiliares: se produce, fundamentalmente, por una inducción de la síntesis por colestasis intra o extrahepática.



No necesariamente se acompaña de aumento de la concentración de bilirrubina. En el gato con hepatopatía las concentraciones son menores que en el perro.

Otras causas en el perro: la administración de corticosteroides o el hiperadrenocorticismismo provocan un aumento de la fracción inducida por corticosteroides. También los anticonvulsivos por inducción de la síntesis de la isoenzima hepática.

GGT (gamma glutamil transferasa)

Enzima unida a membrana celular.

No se ve aumentada en animales en crecimiento.

En el perro solo aumenta 2-3 veces en terapia con anticonvulsivos.

Parece afectarse en menor grado por corticoides.

La vida media de la GGT en el perro es de 72-96 horas.

Se ha demostrado que en perros con lesión renal aguda por el uso de la gentamicina la GGT en orina aumenta antes que los niveles de creatinina (día 1 comparado con día 7).

En gatos la GGT tiene una vida media corta por lo que cualquier aumento sobre los valores normales de esta enzima es un claro indicio de colestasis.

Los gatos con lipidosis hepática presentan aumentos muy significativos de ALP, mientras que la GGT no muestra apenas variación.

En el gato la GGT es más sensible para detectar hepatopatías.

En neonatos se pueden apreciar aumentos de hasta 1.000 veces los valores normales, aumentos que pueden prolongarse hasta los 10-15 días de vida (calostro).

Pruebas de funcionalidad hepática

Como su nombre indica, estiman la funcionalidad del hígado, no teniendo relación directa con la integridad o lesión del hepatocito.



- Albúmina.
- Amoníaco.
- Glucosa.
- Urea.
- Pruebas de coagulación.
- Colinesterasa.
- Colesterol y lípidos.
- Proteinograma.
- Colesterol y lípidos.
- Bilirrubina: es un indicador poco sensible de enfermedad hepatobiliar pero muy específico en ausencia de anemia.
- Ácidos biliares.

Bilirrubina

El esquema general del metabolismo de la bilirrubina puede resumirse en:

- Se forma a partir de la hemoglobina de los eritrocitos.
- En el hígado se conjuga al ácido glucurónico.
- Pasa a vías biliares y posteriormente a digestivo, donde se excreta en su mayoría. Una pequeña parte pasa a circulación y se excreta vía renal.

La bilirrubina total normal en suero es $< 0.3-0.4$ mg/dl. Valores superiores indican un aumento de bilirrubina pero no tienen que producir un color amarillo del plasma o mucosas, ya que un plasma icterico normalmente se produce con niveles de bilirrubina superiores a 1,5 mg/dl y las mucosas ictericas se producen con valores superiores a 3-4 mg/dl.

Los aumentos se van a dar por alteraciones en las tres etapas de su metabolismo:

- Aumento en la destrucción de eritrocitos (anemias hemolíticas).
- Enfermedad hepática.
- Obstrucción del flujo biliar.

Glucosa

El hígado presenta una gran capacidad de reserva funcional para mantener la glucemia normal. Un nivel de glucosa en sangre normal es posible mantenerlo con un 30% de parénquima hepático funcionante.



La glucemia es un indicador específico aunque poco sensible del estado funcional del hígado.

Si en el curso de una hepatopatía aparece la hipoglicemia, el pronóstico es desfavorable salvo en el shunt portosistémico congénito.

Ácidos biliares

Es la prueba de elección para ver la funcionalidad hepática en perro y gato.

Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado a partir del colesterol, donde se conjugan con taurina y se secretan al intestino con la bilis, se reabsorben por el íleon y se transportan al hígado por la vena porta.

En el hígado el 95% de los ácidos biliares que vienen de la porta se reabsorben y vuelven al ciclo enterohepático y una pequeña cantidad pasa al torrente sanguíneo.

Se miden por métodos enzimáticos, principalmente detectan el 3-alfa-hidroxisteroide (no sulfatados), aunque estos no representan más de un 5% de los ácidos biliares totales.

Los ácidos biliares son estables 1 semana a 4°C y 3 meses a -20°C.

Se pueden medir:

Desde un punto de vista diagnóstico se recomienda la determinación de los ácidos biliares preprandial tras 12 horas de ayuno (T0).

Administrar 3-4 cucharadas soperas de comida de buena calidad para pacientes > 5 kg.

Administrar 3-4 cucharaditas de café de comida de buena calidad para pacientes < 5 kg.

Extraer otra muestra de sangre a las 2 horas (T1).

Un aumento en la concentración de ácidos biliares es compatible con disfunción hepática (o alteraciones en los vasos hepáticos), incluso antes de la manifestación de ictericia.



Los valores normales van a variar según el método que se use (en la actualidad hay mucha variabilidad en los métodos que se usan en diferentes laboratorios), y punto de corte que se quiera poner para aumentar o bajar la especificidad. Los prepandriales suelen ser menores 5 o 7 micromoles/L y los postpandriales pueden ser menores de 15, 25 o 35 micromoles/L según el laboratorio.

Interpretación:

Valores normales descartan casi con total seguridad un problema hepático.

En la ictericia hemolítica los niveles de AB son, generalmente, normales a diferencia de la ictericia obstructiva, donde aparecen siempre aumentados.

Los ácidos biliares (AB) en ayunas o pospandriales valoran:

- El flujo sanguíneo portal.
- El parénquima hepático funcional.
- La circulación biliar.

Hay tres alteraciones:

- Si hay un shunt o conexión directa entre la porta y la cava.
- Si hay una alteración del parénquima hepático que hace que los hepatocitos no puedan reabsorber los ácidos biliares. Se podría decir que es más importante en la función del hepatocito la reabsorción de los ácidos biliares que su producción.
- Si hay colestasis u obstrucción de vesícula biliar.

Amoníaco

El amonio se produce por bacterias intestinales, se absorbe por la porta y va al hígado, donde la mayoría es convertido por los hepatocitos en urea mediante el ciclo de la urea. El amonio puede aumentar sus niveles de forma artificial en el plasma si permanece almacenado durante largo tiempo, debido a la generación de amonio en la muestra a partir de sus aminoácidos y urea. También la hemólisis produce falsos aumentos, porque los niveles de amonio dentro de los eritrocitos son 3 veces superiores a los del plasma.



Hay que, para evitar hemólisis, ponerla en EDTA, mantener el tubo cerrado y refrigerado, centrifugar (si es posible en una centrifuga refrigerada) lo antes posible y medir antes de 30 minutos tras la extracción.

En gatos, la anorexia puede dar una deficiencia en arginina, que es un sustrato del ciclo de la urea, y por lo tanto no funcionaría el ciclo de la urea y produciría un aumento del amonio.

La principal diferencia con respecto a los ácidos biliares es que el amonio no va a aumentar por colestasis.

Nitrógeno ureico

A partir del amoniaco, procedente principalmente del intestino, se sintetiza la urea. Una disminución de la concentración sanguínea de BUN aparecerá por disminución de la síntesis hepática. La determinación de BUN como prueba funcional hepática es poco sensible y específica.

Pruebas de coagulación

El hígado juega un papel clave en la hemostasia, ya que en él se lleva a cabo:

- Síntesis de todos los factores de coagulación salvo VIII.
- Síntesis de inhibidores de la coagulación.
- Depuración de factores de la coagulación activados y enzimas fibrinolíticas.

Albúmina

Se sintetiza en el hígado exclusivamente presentando este una gran capacidad de reserva funcional para la síntesis de esta proteína.

La hipoalbuminemia aparece en la insuficiencia hepática grave, con pérdida al menos del 80% de la masa del parénquima hepático funcionante. Será subaguda o crónica, ya que la vida media de la albúmina sanguínea en pequeños animales es de 8-10 días.



PARÁSITOS HEMÁTICOS TRANSMITIDOS POR GARRAPATAS DE INTERÉS EN PEQUEÑOS ANIMALES

Dr. Ángel Sainz Rodríguez

Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Hospital Clínico Veterinario
Complutense. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

Las enfermedades de transmisión vectorial han cobrado especial relevancia en los últimos años dada la diseminación de algunas de ellas a nuevos entornos, así como a su importancia tanto desde un punto de vista clínico y de salud pública como económico. Se estima que constituyen aproximadamente el 7% del total de las enfermedades infecciosas, provocando considerables pérdidas económicas en la industria agropecuaria.

En el caso concreto de las enfermedades transmitidas por garrapatas, son muchos los factores que están influyendo en el concepto que clásicamente se tenía de ellas. Entre ellos debemos destacar el cambio en las condiciones ambientales actuales, incluyendo las climáticas, los cambios de las actividades de las personas y de los animales o las variaciones del uso de la tierra. Todo ello, unido a una evidente mejora en las técnicas diagnósticas, así como en el propio seguimiento de estas enfermedades, ha dado lugar a la descripción de determinadas especies de garrapatas o patologías transmitidas por ellas en zonas en las que previamente no se habían detectado.

Si nos referimos específicamente a los animales de compañía, el rol social de los mismos motiva la cada vez mayor frecuencia con la que estos viajan con sus propietarios a otras latitudes, pudiendo contraer enfermedades poco habituales en su lugar de origen. Además, es cada vez más habitual la importación de animales infectados procedentes de zonas endémicas a zonas no endémicas, como ocurre en nuestro país con la importación de perros de algunos países del centro y este de Europa y viceversa. También se debe tener en cuenta la especial importancia de las colectividades en el mantenimiento de muchas de estas patologías que, muy frecuentemente, se presentan en forma de coinfecciones o parasitosis múltiples.

Son aproximadamente 16 las especies de garrapatas que pueden parasitar a perros y gatos en Europa. Desde un punto de vista clínico, probablemente las más



relevantes son *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus* y *Dermacentor reticulatus*. Todas ellas son garrapatas de 3 hospedadores, ya que dejan el hospedador para alimentarse y mudar de fase a fase: larva, ninfa y adulto. La mayoría de las garrapatas que se alimentan en los animales de compañía son adultas, mientras que las formas inmaduras suelen preferir alimentarse en animales silvestres. La excepción es *R. sanguineus*, cuyas larvas y ninfas también suelen alimentarse en el perro.

I. ricinus es la garrapata más habitual en Europa, si bien no suele encontrarse en el área mediterránea. En nuestro país es especialmente frecuente en todo el norte de España, incluido Galicia. Puede transmitir *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato o el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, entre otros.

D. reticulatus es también muy habitual en muchos países europeos, siendo su presencia en nuestro país frecuente en amplias zonas de Galicia, Asturias, Cantabria y País Vasco, siendo también habitual en las sierras de Castilla-León y, en menor medida, en La Rioja. Es el vector de *Babesia canis*, especie muy importante desde un punto de vista clínico.

R. sanguineus es la garrapata más frecuente en los países mediterráneos, siendo su presencia muy habitual en perros de nuestro país. Esta especie de garrapata es capaz de transmitir *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni*, *Hepatozoon canis* y *Ehrlichia canis*.

A continuación, nos vamos a referir fundamentalmente a aquellas patologías causadas por diferentes especies de *Babesia*, *Cytauxzoon* y *Hepatozoon*.

Aspectos diagnósticos de enfermedades causadas por parásitos hemáticos transmitidos por garrapatas

El diagnóstico de las enfermedades vectoriales se puede llevar a cabo empleando diferentes estrategias y teniendo siempre en cuenta las características específicas del agente causal y la patogenia de la enfermedad que causan, en especial, su patocronia y, más concretamente, su persistencia en casos crónicos y subclínicos. Cada una de las técnicas diagnósticas que se emplean posiblemente tiene sus ventajas y sus limitaciones, por lo que cada vez es más ampliamente recomendado el empleo de varias de ellas de modo simultáneo, especialmente, en casos conflictivos.



En líneas generales, en las enfermedades transmitidas por garrapatas debemos considerar la habitual existencia de un periodo de gracia variable (habitualmente, de unas 4-48 horas) tras la picadura de la garrapata, en el que las técnicas diagnósticas no suelen arrojar resultados positivos. Posteriormente suele ser recomendable el empleo de técnicas que buscan la detección del agente causal (por inspección en frotis, técnicas moleculares o cultivo), para a continuación cobrar utilidad las técnicas serológicas que buscan la respuesta del hospedador a la infección o parasitosis.

Babesiosis

La babesiosis canina es probablemente la enfermedad hemática parasitaria transmitida por garrapatas de mayor importancia clínica en España, en especial, en la zona norte del país. En estos últimos años se han producido numerosas novedades relacionadas con la taxonomía y el diagnóstico de diferentes especies de *Babesia*. Clásicamente, la taxonomía de las especies de *Babesia* estaba basada fundamentalmente en criterios morfológicos del protozoo en el eritrocito en función de su visualización microscópica en frotis sanguíneos. De este modo las babesias se clasificaban como de gran tamaño (como *B. canis*) y de pequeño tamaño (como *B. gibsoni*).

La aplicación de la biología molecular ha permitido la identificación de muchas nuevas especies de *Babesia* de interés en pequeños animales y, más concretamente, en el perro. Así, entre las especies de tamaño grande que hasta hace poco tiempo se consideraban *B. canis*, en la actualidad se distinguen *B. canis*, *B. rossi*, *B. vogeli* y una especie de *Babesia* relacionada con *B. bigemina* detectada en Carolina del Norte. En el caso de las especies pequeñas, además de *B. gibsoni*, son especies actualmente reconocidas *B. conradae* y la actualmente denominada *B. vulpes*. Esta última especie fue descrita por vez primera en nuestro país a finales de los años 90 y ha sido objeto de una gran controversia taxonómica. A lo largo del tiempo ha recibido diferentes denominaciones como *B. microti-like*, *B. cf microti* o *Theileria annae*. El empleo de esta última denominación ha sido muy frecuente, basándose en determinados estudios filogenéticos y postulando la posibilidad de que alguna especie del género *Theileria* pudiera ser capaz de parasitar al perro. Sin embargo, ello era muy controvertido debido a que no se ha podido confirmar la presencia de un estado preeritrocitario en linfocitos ni la existencia de transmisión transovárica en la garrapata vector que, aunque se ha propuesto que se trata de *Ixodes hexagonus*, aún no ha sido identificada completamente.



La nueva denominación, *B. vulpes*, se basa tanto en estas características como en un estudio filogenético completo y en la descripción del hospedador natural habitual de esta especie, el zorro.

En España las especies de *Babesia* que han sido claramente identificadas hasta la fecha son *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. vogeli* y *B. vulpes*. Son aún muchas las áreas de nuestro país de las que no disponemos de información epidemiológica alguna. En general, la mayoría de las descripciones proceden de la zona norte, lo cual parece lógico si tenemos en cuenta su asociación con las especies de garrapatas que actúan como vectores. Sin embargo, teniendo en cuenta que algunas especies de *Babesia* como *B. vogeli*, son transmitidas por *R. sanguineus*, no es de extrañar la descripción de esta especie en otras zonas de España. Por otro lado, los habituales desplazamientos de perros de unas zonas a otras de nuestro país podrían justificar las prevalencias de infección por *Babesia* detectadas en algunas zonas no endémicas de nuestro país.

Las técnicas más empleadas en el diagnóstico de la babesiosis son: la detección directa del parásito en frotis sanguíneos, las técnicas serológicas y las técnicas moleculares (PCR). La evaluación del frotis de sangre ha sido el método de diagnóstico históricamente más empleado y aún conserva su valor, en especial, en casos agudos infectados por formas grandes de *Babesia* como *B. canis* o *B. vogeli*. Aunque su sensibilidad parece ser menor en casos infectados por especies de pequeño tamaño, la observación del frotis debería ser el primer método a emplear en animales enfermos. Algunos autores sugieren que el empleo de sangre capilar, como la obtenida de la oreja, podría aumentar la sensibilidad diagnóstica de la técnica.

Existen diferentes técnicas serológicas disponibles para el diagnóstico de babesiosis, tanto cualitativas como cuantitativas, siendo las cuantitativas habitualmente más sensibles y específicas que las técnicas rápidas cualitativas. No existe antígeno disponible de todas las especies de *Babesia* presentes en nuestro país, siendo el más empleado el de *B. canis*. No obstante, son pocos los estudios que evalúan la sensibilidad y especificidad de estas técnicas. Además la existencia de reacciones cruzadas entre diferentes especies, la dificultad en la interpretación de un resultado positivo (exposición versus infección) y la existencia de falsos negativos en fases agudas hacen que su empleo en la práctica sea limitado.

Por otro lado, la PCR es una técnica muy útil, tanto en estudios epidemiológicos como en el diagnóstico individual, siendo más sensible que la detección microscópica del agente causal. Existen diferentes técnicas moleculares que van a



permitir la identificación y diferenciación de las diferentes especies de *Babesia*, destacando la *nested* PCR, *reverse line blotting* (RLB) y PCR-RFLP. La muestra de elección suele ser la sangre periférica. La importancia de la identificación exacta de la especie infectante no es solo taxonómica sino clínica, ya que el pronóstico de las parasitaciones causadas por las diferentes especies de *Babesia* no es el mismo. En general, las especies de pequeño tamaño responden peor a los tratamientos convencionales y, en muchos casos, no se produce una curación parasitológica post-terapéutica.

La PCR es también una buena técnica para evaluar la respuesta al tratamiento. Teniendo en cuenta la habitualmente incompleta respuesta al tratamiento en el caso de babesiosis causada por formas pequeñas y que además la sensibilidad de la técnica no alcanza el 100%, los consensos actuales tienden a recomendar el empleo de 2 técnicas de PCR consecutivas, realizadas al menos 2 meses después del tratamiento y separadas por un mínimo de 15 días, para confirmar la posible curación parasitaria.

Otros parásitos hemáticos transmitidos por garrapatas

En los últimos años se han producido diferentes novedades en el diagnóstico de algunos parásitos hemáticos transmitidos por garrapatas en nuestro entorno geográfico. En este sentido, la *cytauxzoonosis* felina era considerada hasta hace muy poco tiempo una enfermedad sobreaguda que cursaba con una elevada mortalidad. El desarrollo de las técnicas moleculares ha puesto de manifiesto la existencia de infecciones menos graves o subclínicas en gatos de nuestro entorno geográfico. Desde un punto de vista epidemiológico también es de destacar la detección de *Cytauxzoon spp.* en linceos del sur de España, causando igualmente infecciones subclínicas. Los métodos de diagnóstico empleados en estos casos han sido, fundamentalmente, moleculares y, en algún caso, por microscopía.

Mucho más habitual es la detección de *Hepatozoon canis* en perros, en especial, en aquellos con infestaciones masivas por garrapatas. Con el empleo de técnicas moleculares, la prevalencia encontrada en nuestro entorno geográfico es de un 3-8%, dependiendo de los estudios. Datos similares se han encontrado para *Hepatozoon felis* en gatos de nuestro país. Dado el peculiar modo de transmisión de *Hepatozoon spp.*, su diagnóstico debería acompañarse de la exclusión de múltiples coinfecciones y, más específicamente, de enfermedades transmitidas por garrapatas como babesiosis, ehrlichiosis, anaplasmosis o enfermedad de Lyme,



las cuales tienen una prevalencia variable en España, en función del área geográfica concreta en la que nos encontremos. Aunque en sentido estricto, muchas de estas enfermedades son infecciosas, las especies del género *Ehrlichia* y *Anaplasma* suelen comportarse como parásitos intracelulares obligados, guardando muchas similitudes con muchas enfermedades parasitarias. Las coinfecciones suponen un auténtico reto diagnóstico para el clínico, ya que en muchos casos varios patógenos son capaces de producir cuadros clínicos y alteraciones hematológicas y bioquímicas muy similares. Aunque se ha sugerido que las coinfecciones en un mismo hospedador por dos o más patógenos transmitidos por vectores potencialmente podrían inducir una inmunosupresión sinérgica, agravando el cuadro clínico, son necesarios más estudios que confirmen esta hipótesis.

Finalmente, no se debe olvidar la importancia zoonótica de algunas de estas enfermedades transmitidas por garrapatas. En este sentido, recientes estudios han mostrado la existencia de infecciones por *A. platys* en personas, especie que tan solo se había encontrado en cánidos.

Referencias

Criado-Fornelio A., Rey-Valeiron C., Buling A., Barba-Carretero J.C., Jefferies R., Irwin P. Vet Parasitol. 2007 Mar 31;144(3-4):261-9. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain.

Halos L., Lebert I., Abrial D., Danlois F., Garzik K., Rodes D., Schillmeier M., Ducrot C., Guillot J. Questionnaire-based survey on the distribution and incidence of canine babesiosis in countries of Western Europe. Parasite. 2014;21:13.

Luaces I., Aguirre E., García-Montijano M., Velarde J., Tesouro M.A., Sánchez C., Galka M., Fernández P., Sainz A. First report of an intraerythrocytic small piroplasm in wild Iberian lynx (*Lynx pardinus*). J Wildl Dis. 2005 Oct;41(4):810-5.

Maggi R.G., Mascarelli P.E., Havenga L.N., Naidoo V., Breitschwerdt E.B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. Parasit Vectors. 2013 Apr 15;6:103.

Millán J., Naranjo V., Rodríguez A., de la Lastra J.M., Mangold A.J., de la Fuente J. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of Cytauxzoon species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. Parasitology. 2007 Jul;134(Pt 7):995-1001.



Miró G., Montoya A., Roura X., Gálvez R., Sainz A. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasit Vectors*. 2013 Apr 22;6:117.

Miró G., Checa R., Paparini A., Ortega N., González-Fraga J.L., Gofton A., Bartolomé A., Montoya A., Gálvez R., Mayo P.P., Irwin P. *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. *Parasit Vectors*. 2015 Apr 10; 8:217.

Ortuño A., Castellà J., Criado-Fornelio A., Buling A., Barba-Carretero J.C. Molecular detection of a Hepatozoon species in stray cats from a feline colony in North-eastern Spain. *Vet J*. 2008 Jul;177(1):134-5.

Sainz Á., Roura X., Miró G., Estrada-Peña A., Kohn B., Harrus S., Solano-Gallego L. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors*. 2015 Feb 4;8:75.

Tabar M.D., Francino O., Altet L., Sánchez A., Ferrer L., Roura X. PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniasis. *Vet Rec*. 2009 Jan 24;164(4):112-6.



AUDITORÍAS ESTATALES DE LABORATORIOS EN IRLANDA: EJEMPLO DEL BVD Y ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES

Dr. José María Lozano Cantín

Sección de Virología de los Laboratorios Veterinarios de Department of Agriculture Food & the Marine (DAFM), Irlanda

La primera unidad de auditorías de laboratorios del Department of Agriculture, Food and the Marine (DAFM) en Irlanda se creó en el año 2004, principalmente para cubrir auditorías de los laboratorios privados encargados del análisis de encefalopatías transmisibles. Los test rápidos de detección de encefalopatías transmisibles en Irlanda han sido siempre llevados a cabo en laboratorios privados, y la legislación europea (Reglamento CE/999/2001) exige que el laboratorio nacional de referencia controle y audite estos laboratorios. Con el tiempo, el ámbito de actuación de la unidad de auditorías se extendió a otras áreas en las que laboratorios privados realizan análisis oficiales en Irlanda: *Trichinella*, residuos, zoonosis dentro del ámbito de la legislación europea. Además de laboratorios realizando análisis oficiales, la unidad de auditorías de laboratorio cubría otros cometidos como inspección de laboratorios que realizan análisis de *Salmonella* para exportaciones a los Estados Unidos, o análisis de metritis contagiosa equina exigidos por el “Code of Practice” dentro de un acuerdo voluntario entre organizaciones de criadores de Alemania, Francia, Gran Bretaña, Irlanda e Italia. En ocasiones, el grupo de auditorías internas realizaba también investigaciones en casos de sospechas de fraude o problemas puntuales de salud pública o animal.

El estándar por el que se rige cada auditoría o inspección varía en función de los requerimientos de la legislación, y si la legislación no es suficientemente explícita, en función de normas internacionales, o estándares exigidos por la OIE para el análisis de los diferentes patógenos. En general, si bien existe un control de aspectos puntuales de los sistemas de calidad, la inspección del sistema de calidad de cada laboratorio la realiza INAB, equivalente a ENAC en España.

En el año 2008 se creó en Irlanda el State Veterinary Service Internal Audit Group (SVSIAG) dentro del Department of Agriculture, Food and the Marine (DAFM). Este grupo absorbió la unidad de auditorías de laboratorios, que se unió a otras dos unidades de auditorías en los ámbitos de salud pública y salud y bienestar animal.



La función principal del SVSIAG es cumplir la legislación europea en materia de análisis oficiales descrita en el Reglamento 882 del año 2004, que establece que cada país debe tener un sistema de auditorías internas en el control de análisis oficiales: “Las autoridades competentes realizarán auditorías internas o podrán ordenar la realización de auditorías externas y, atendiendo al resultado de éstas, tomarán las medidas oportunas para asegurarse de que están alcanzando los objetivos del presente Reglamento. Dichas auditorías serán objeto de un examen independiente y se realizarán de manera transparente”. El SVSIAG se organiza independientemente del resto del organigrama del servicio veterinario y es dependiente directamente del Director Veterinario de DAFM.

La unidad de salud pública se encarga de auditar la estructura de DAFM a cargo del control de grandes mataderos, salas de despiece y de empresas lácteas (solo leche líquida, no derivados lácteos). La unidad de salud animal está a cargo de auditar aquellas estructuras encargadas del control de granjas, del transporte de animales y de los movimientos de animales en general, incluyendo ferias de venta de animales, tratantes, transportistas, etc.

La unidad de laboratorios se encarga de auditorías internas de laboratorios de DAFM y también de auditorías de aquellos laboratorios privados que analizan muestras pertenecientes a controles oficiales, dentro del marco de la legislación europea e irlandesa.

La organización de auditorías se realiza de acuerdo a los principios recogidos en la Decisión de la Comisión 677 de 2006. En este texto se recogen unas premisas que deben cumplir las unidades de auditorías internas de cada país:

1. Enfoque sistemático

Las actividades y procedimientos del servicio de auditorías deben estar documentados, incluyendo la preparación de un plan anual de auditorías y las auditorías en sí mismas.

La preparación del plan anual de auditorías comienza con la elaboración del “universo de auditorías”, que incluye todas las áreas susceptibles de ser auditadas dentro del ámbito de la legislación. Cada año se realiza una evaluación de riesgos entre todas las áreas del universo de auditorías. La evaluación de riesgos incluye elementos como el riesgo para la salud pública y para la salud animal, posibles



consecuencias financieras, de reputación o de alarma social, la frecuencia de auditorías previas en el área (Figura 1).

Dentro del proceso de auditoría, otros procedimientos documentados incluyen el envío de un cuestionario previo, las inspecciones, la elaboración de informes después de cada visita y el informe final (Figura 2). En particular, es especialmente importante el seguimiento de las conclusiones y recomendaciones, y el informe no se considera cerrado hasta que la unidad auditada no presenta un plan de acción incluyendo una fecha de resolución.

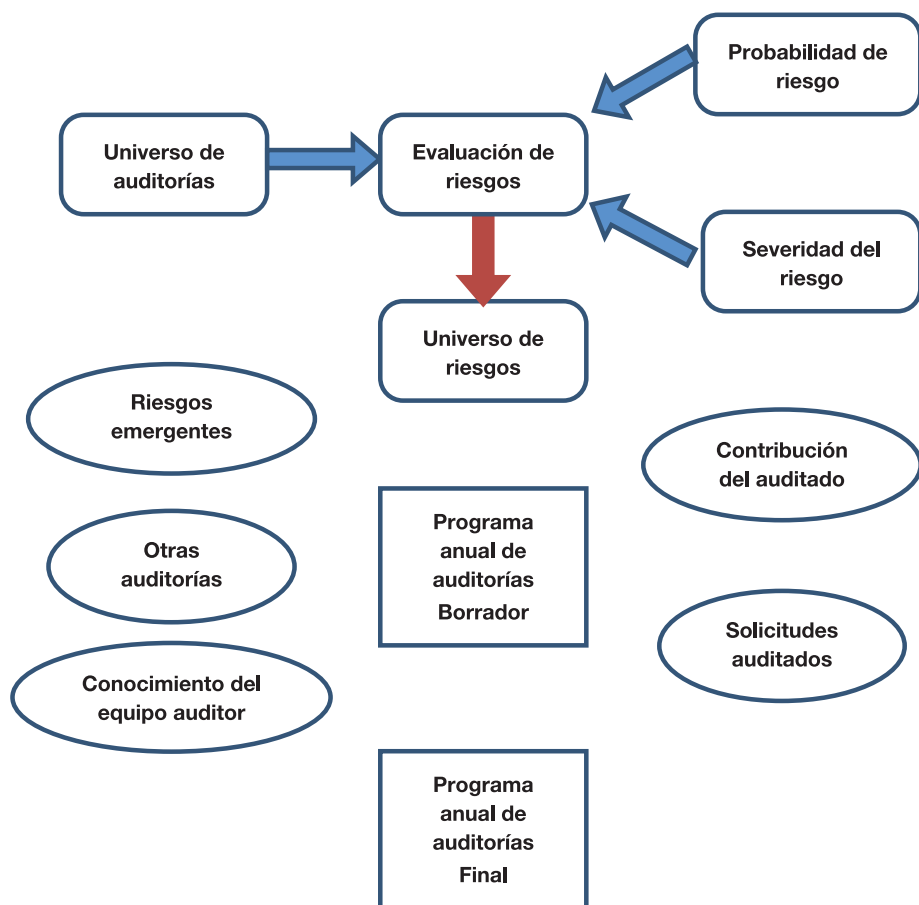


Figura 1. Elaboración del plan anual de auditorías

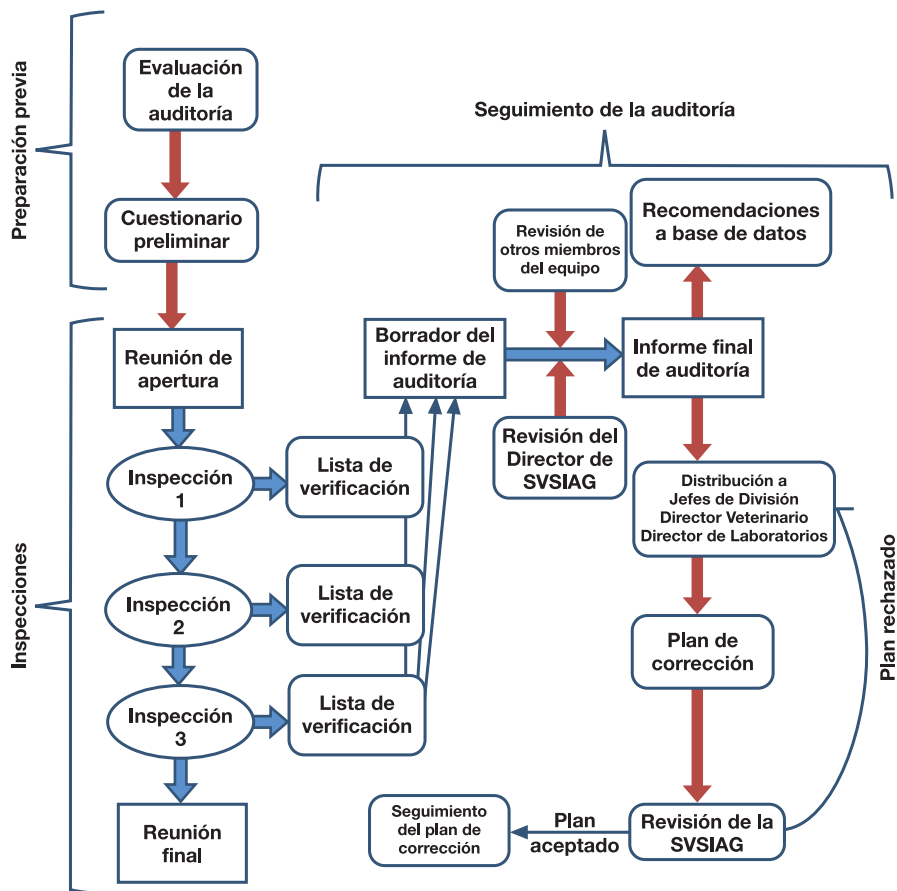


Figura 2. Proceso de auditoría interna en el Department of Agriculture, Food and the Marine en Irlanda, desde la fase de preparación hasta la fase final de seguimiento del plan de corrección de no conformidades

2. Transparencia

En Irlanda el principal mecanismo de transparencia es el “freedom of information act”, por el cual cualquier ciudadano puede requerir información relativa a asuntos estatales.

3. Independencia

El SVSIAG depende directamente del Director Veterinario (Chief Veterinary Officer), y no está ligado a ninguna de las divisiones del State Veterinary Service.



4. Examen independiente del proceso de auditoría

Los informes y procedimientos del SVSAIG pueden ser auditados por diferentes grupos irlandeses, europeos e internacionales. Hasta ahora, sus informes han sido requeridos e investigados por la Food Safety Authority of Ireland (FSAI), la Food and Veterinary Office de la Unión Europea y la Food and Drugs Administration de los Estados Unidos.

Otro mecanismo interno de control en DAFM es el Comité Asesor de Gestión (Management Advisory Committee), del que forman parte personas externas a la propia organización, que supervisa el cumplimiento del programa anual de auditorías, la publicación de informes dentro de los plazos y el seguimiento de las recomendaciones.

Las auditorías internas de laboratorios oficiales incluyen por una parte los análisis realizados en laboratorios de DAFM, incluyendo la transferencia de resultados a las autoridades competentes y el seguimiento de resultados si fuere necesario. En aquellos casos donde los análisis oficiales sean realizados por laboratorios privados es función del Laboratorio Nacional de Referencia monitorizar y controlar los laboratorios privados, y la unidad de laboratorios del SVSIAG inspeccionará esa labor.

Las funciones del Laboratorio Nacional de Referencia pueden ser diferentes dependiendo de la legislación bajo la que esté designado, y la unidad de auditorías tiene que adaptar sus estándares dependiendo del área auditada y la legislación correspondiente.



COMUNICACIONES ORALES





01

GARRAPATAS IXÓDIDAS EN VACUNO DE CARNE DE ASTURIAS: ESPECIES, PREVALENCIA Y ESTACIONALIDAD

Alberto Espi¹, Ana de Cerro¹, Paula García² y J. Miguel Prieto¹

¹Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Área de Sanidad Animal, Centro de Biotecnología Animal, Deva, Gijón, Asturias.

²Astrid y Paula Servicios Veterinarios C.B. Gijón, Asturias

El control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten es un componente importante de los programas de Sanidad Animal. La combinación de los exámenes de la vegetación con los exámenes de animales es la mejor manera de conocer las especies de garrapatas endófilas y exófilas presentes en un área. En base a estas premisas, nos planteamos dos objetivos: identificar las especies de ixódidos presentes en el vacuno de Asturias y caracterizar los ciclos de las especies de garrapatas más abundantes, definiendo los periodos de actividad de cada estadio a lo largo del año. Se estableció como zona de estudio la Sierra del Sueve, en la que conocemos la coincidencia espacial de garrapatas, ganado en extensivo y especies silvestres. Entre noviembre de 2011 y julio de 2014, se muestrearon un total de 83 animales de 4 explotaciones bovinas, recogiendo un total de 1.208 garrapatas. En la identificación posterior, se contabilizaron 1.028 ejemplares adultos, 120 ninfas y 60 larvas, pertenecientes a 6 especies. La especie predominante entre los ejemplares adultos y larvas ha sido *Ixodes ricinus* (65,95% y 68,33%) y entre las ninfas *Rhipicephalus bursa* (45,83%). En un rebaño vacuno fue posible realizar un seguimiento detallado a lo largo de un año completo, examinando los animales en los pastos de montaña a finales de julio y a finales de septiembre de 2012 y en la estabulación a finales de diciembre de 2012 y en mayo de 2013. La información proporcionada por este seguimiento pone de manifiesto las notables variaciones en las proporciones relativas de las especies y estadios de ixódidos que parasitan un mismo rebaño a lo largo del año. El estudio de las garrapatas en animales proporciona información sobre la relevancia del problema en la ganadería asturiana y permite conocer los momentos óptimos para la aplicación de tratamientos acaricidas.

Trabajo financiado por el INIA y fondos FEDER (Proyecto RTA 2011-00008-CO2-01).



02

APLICACIÓN DE UN ELISA DESARROLLADO PARA GAMOS (*Dama dama*) EN EL INMUNODIAGNÓSTICO DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA

**J. Miguel Prieto¹, Ana de Cerro¹, Ana Balseiro¹, Alberto Espí¹,
Marta Alonso-Hearn², Joseba Garrido² y Rosa Casais¹**

¹Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA),
Área de Sanidad Animal, Centro de Biotecnología Animal, Deva, Gijón, Asturias.

²Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-Tecnalia),
Derio, Vizcaya, País Vasco

La técnica ELISA es la herramienta de diagnóstico más usada para controlar *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) en el ganado bovino, siendo su principal limitación la falta de sensibilidad en los estadios iniciales de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue comparar en la especie bovina la capacidad de detección de anticuerpos frente a *Map* de dos ELISAs (ELISA-1 y ELISA-2). El ELISA-1, de desarrollo propio, está basado en un antígeno preparado a partir de la cepa *Map*-SU89 aislada de gamos de la Sierra del Suevo, utiliza proteína G marcada con peroxidasa como conjugado y tiene una sensibilidad y una especificidad en esta especie del 72 y el 100%, respectivamente. El ELISA-2 (ID^{VEI}) validado para el diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado bovino, ovino y caprino se realizó y se interpretó siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se realizó en dos rebaños: el A de 93 animales de raza asturiana de la montaña que compartía pastos con los gamos de donde se aisló la cepa *Map*-SU89, y el B de 81 vacas de raza asturiana de los valles sin contacto con los gamos. En el año 2012, tanto en el rebaño A como en el B se diagnosticó clínicamente paratuberculosis bovina en cuatro animales, confirmada posteriormente por histopatología, además, en el caso del rebaño B se consiguió el aislamiento de *Map* en dos animales. Al final de la temporada de pastos comunales se tomó a todos los animales una muestra de sangre y otra de heces. Con los sueros se realizaron los ELISAs. Las muestras de heces se congelaron a -20°C y en ellas se llevó a cabo una PCR (IS900) y un cultivo en medio de Herrold suplementado con micobactina. El ELISA-1 detectó en el rebaño A veintitrés animales positivos y en el rebaño B veintidós, frente a los seis y siete que detectó el ELISA-2, respectivamente. En el rebaño A la PCR y el cultivo resultó negativo en todos los animales,



mientras que en el rebaño B se encontraron tres animales positivos por PCR y uno por cultivo. Como conclusión, el ELISA-1 mejora la detección de animales seropositivos con respecto al ELISA-2, lo que podría ser de gran utilidad en el control de la paratuberculosis bovina. Así mismo, el cultivo negativo de *Map* en el rebaño A, tanto en tejidos como en heces, podría indicarnos que el fenotipo de las cepas causantes de la enfermedad estarían más próximas a las de gamo que a las de origen bovino, dada la dificultad que hemos observado para el aislamiento del *Map* en los gamos de Asturias.

Trabajo financiado por el INIA y fondos FEDER (Proyectos FAU 2008-00018-CO2 y RTA 2014-00009-CO2-02).



03

***Clostridium difficile*, UN PATÓGENO SIN BARRERAS**

**Carlos Neila, José L. Blanco, Cristina Orden, Sergio Álvarez-Pérez
y Marta E. García**

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense, Madrid

Clostridium difficile (CD) es una bacteria cuyo poder patógeno en animales y humanos ha despertado el interés científico en todo el mundo. CD crece en anaerobiosis, pero es capaz de resistir la presencia de oxígeno en el medio gracias a la formación de esporos. Esto proporciona a este microorganismo extraordinaria ubicuidad y hace que además de encontrarse en el organismo vivo sea capaz de resistir las condiciones ambientales. La lentitud de crecimiento de CD, unida a la necesidad de utilizar medios selectivos y la no existencia de un procedimiento de análisis estandarizado, hace que las prevalencias de este microorganismo sean muy variables en los estudios. Se ha analizado la presencia de CD en superficies, suelos, seres vivos, alimentos, etc. La disparidad de resultados obtenidos nos hace plantearnos si el obtener bajas prevalencias es realmente una ausencia de este microorganismo o, ya sea por metodología o por otras causas, la presencia de falsos negativos es considerable. En un estudio realizado en nuestro laboratorio se realizó una comparación de tres metodologías diferentes para el análisis de prevalencias en una población de ganado porcino, obteniendo una gran variedad de resultados. Por otro lado, en un estudio de superficies realizado recientemente, aumentaba de forma drástica la presencia de CD tras una optimización del procedimiento de aislamiento. Al analizar los resultados obtenidos en los diferentes procesos de aislamiento de CD se plantea la posibilidad de que CD esté presente entre nosotros en todo momento y que seamos incapaces de aislarlo de una forma efectiva. En definitiva, que su presencia en el ambiente que nos rodea se encuentre claramente minusvalorada.

Estudio financiado mediante el proyecto AGL2013-46116-R del Ministerio de Economía y Competitividad.



04

PREVALENCIA DE *Clostridium difficile* EN PERROS CON ENFERMEDAD DIGESTIVA

Cristina Orden¹, José L. Blanco¹, Sergio Álvarez-Pérez¹, Mercedes García-Sancho², Fernando Rodríguez-Franco², Ángel Sainz², Alejandra Villaescusa² y Marta E. García¹

¹Departamento de Sanidad Animal, Universidad Complutense, Madrid.

²Hospital Clínico Veterinario, Universidad Complutense, Madrid

Clostridium difficile (CD) es una bacteria ubicua cuya importancia radica en su carácter patógeno en humanos y animales. Debemos destacar el importante papel de los animales como reservorio de CD, tanto por sus implicaciones zoonóticas como por su patogenicidad en diferentes especies animales. El objetivo de este trabajo fue estudiar la prevalencia de CD en perros que acudieron al Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid. Se analizaron 108 animales con distintos tipos de enfermedad del tracto digestivo, de los cuales 80 presentaban además diarrea. En todos los casos las muestras fecales se tomaron con un hisopo de algodón estéril. Las muestras de heces se procesaron de la manera habitual en nuestro laboratorio. Brevemente, se sometieron a un shock en etanol para seleccionar formas esporuladas, tras lo cual se realizó su incubación en medio líquido de enriquecimiento para CD durante 7 días, y una posterior siembra en medio selectivo sólido, también para CD. La incubación de todos los cultivos bacterianos en medio líquido y sólido se realizaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Se obtuvieron un total de 14 muestras positivas a CD. El posterior estudio detallado de estos aislamientos determinó que se trataban de 9 cepas toxigénicas pertenecientes a los ribotipos 010, 078 y 106, y 5 cepas no toxigénicas del ribotipo 010. En cuanto a la sensibilidad antibiótica destacó la resistencia estable a metronidazol de 4 de los aislados. Se analizó la posible relación entre la presencia de CD y la presencia de enfermedad crónica, diarrea, vómitos o tratamientos antibióticos. Mediante el test exacto de Fisher solo se observaron asociaciones marginalmente significativas en el caso de animales positivos y bajo tratamiento antibiótico, y animales con cepas toxigénicas que presentaron vómitos.

Estudio financiado mediante el proyecto AGL2013-46116-R del Ministerio de Economía y Competitividad.



05

NUEVAS HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA DE PESTE PORCINA AFRICANA

**P. Sastre, C. Gallardo, M. Arias, C. Netherton, L. Dixon, S. Bloome,
A. Monedero, T. Ruiz, J. García y P. Rueda**

Inmunología y Genética Aplicada, S.A. (INGENASA), Madrid

El virus de la peste porcina africana (VPPA) infecta a cerdos domésticos y jabalíes causando una grave enfermedad que acaba en la muerte del animal en la mayoría de los casos. También infecta a cerdos salvajes donde la enfermedad es asintomática. Actualmente la peste porcina africana es endémica en África y Cerdeña. Recientemente, han surgido algunos brotes en países de la UE como Lituania, Polonia, Letonia y Estonia, lo que ha hecho que los sistemas de alerta y vigilancia se reactiven. No existe vacuna contra el virus y el único control efectivo se basa en la identificación y sacrificio de los animales infectados. Por ello, la detección temprana de la enfermedad es esencial a la hora de establecer un sistema de vigilancia efectivo y medidas de control adecuadas para prevenir su diseminación. Este trabajo se ha centrado en el desarrollo de nuevas herramientas para la detección temprana de la infección por VPPA. Por un lado, un ELISA para la detección de inmunoglobulinas IgM, como marcador indirecto de una reciente infección. Se analizó la respuesta IgM frente a dos antígenos del virus: un antígeno temprano y la proteína mayoritaria de la cápsida y altamente inmunogénica, VP72. La puesta a punto del ensayo se realizó con una colección de sueros experimentales procedentes de cerdos infectados experimentalmente con distintos aislados virales (cedidos por el laboratorio de referencia europeo de PPA, CISA-INIA). Los resultados indicaron que el test es capaz de detectar anticuerpos a día 10 post infección (pi) frente a la proteína VP72. Por otro lado, se ha desarrollado un ensayo de inmunocromatografía para detección de antígeno viral, basado en partículas de látex cubiertas con un anticuerpo monoclonal específico de la proteína VP72. Las tiras fueron diseñadas para su uso con sangre, facilitando así el procesamiento de la muestra. Esto, junto con las características propias del ensayo, hace que sea propicio para su uso en laboratorios sencillos o incluso en campo, sin necesidad de equipamiento de laboratorio ni personal cualificado. La validación del ensayo con muestras de sangre de animales experimentales, indicó que el test detecta la infección entre día 3-7 pi, dependiendo de la virulencia del aislado viral.



06

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE INMUNOTERAPIA DESENSIBILIZANTE EN PERROS ALÉRGICOS

Luis A. Rivas, Belén Barreiro y Antonio Sanz

Inmunología y Genética Aplicada, S.A. (INGENASA), Madrid

La alergia es una enfermedad mediada por IgE que puede cursar con diferentes síntomas, siendo la dermatitis atópica la manifestación más frecuente en perros. Algunos autores refieren que la alergia afecta hasta a un 20% de la población canina. El diagnóstico de la alergia se basa en los síntomas y la historia clínica del paciente. La inmunoterapia es el único tratamiento específico para la alergia ambiental que persigue eliminar o al menos disminuir la sensibilización de los pacientes a los alérgenos curando al paciente o paliando sus síntomas. La inmunoterapia alcanza según algunos estudios hasta el 85% de eficacia, englobando a los pacientes en los que se han eliminado totalmente los síntomas (hasta un 20%) y a los que han mejorado y podido reducir la medicación sintomática. En veterinaria no existen protocolos de inmunoterapia estandarizados ni evidencias contrastadas de que una pauta o vía de administración sea más eficaz que otra. La identificación de las IgE específicas a los alérgenos es crucial para formular eficazmente la inmunoterapia. INGENASA ha desarrollado un ensayo serológico canino propio basado en microarrays de extractos alérgénicos que explota las ventajas de esta técnica: miniaturización y multiplex. Nuestro ensayo da soporte al desarrollo y evaluación de tratamientos desensibilizantes en colaboración con BIAL. Hemos analizado el perfil de sensibilización de 109 sueros de perros diagnosticados clínicamente como alérgicos. 11 perros de diferentes razas, sexos, edades y sensibilizaciones se están sometiendo, con el consentimiento del dueño y la colaboración de las clínicas, a tratamientos con vacunas individualizadas de liberación retardada (depot) en forma de suspensión inyectable para administración subcutánea. El tratamiento se divide en sendos periodos de iniciación (15 semanas) y de continuación (al menos un año), durante los que se administran cantidades crecientes de extractos alérgénicos en periodos semanales y mensuales, respectivamente. Ningún perro ha mostrado reacciones locales ni sistémicas tras la administración de las dosis. Después del periodo de iniciación, solo un perro ha empeorado y su dueño ha renunciado a continuar el tratamiento. La eficacia de la terapia se evaluará definitivamente después de un año según los síntomas clínicos mediante el criterio CADESI y los niveles serológicos de IgE e IgG específicos de alérgenos mediante microarrays.



07

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG E IgM ESPECÍFICOS DE *M. bovis* EN CERDOS Y JABALÍES

**I. Gonzalez¹, T. Ruiz¹, L. López¹, B. Romero², L. de Juan²,
C. Gortazar³, P. Rueda¹ y A. Venteo¹**

¹Inmunología y Genética Aplicada, S.A. (INGENASA), Madrid. ²Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, Madrid. ³Instituto de Investigación de Recursos Cinegéticos (Sabio-IREC), Universidad de Castilla-La Mancha

La ganadería bovina es el principal sector afectado por la infección tuberculosa causada casi siempre por *Mycobacterium bovis*. Sin embargo, otras especies animales como el cerdo pueden verse afectadas. Tanto cerdo criado en intensivo como en extensivo, así como el jabalí, suelen presentar una potentísima respuesta inmunológica frente a una infección por *M. bovis*. A pesar de ello, son muy susceptibles a la enfermedad y el contagio entre ellos y otras especies con las que puedan entrar en contacto podría ser elevado.

Por otra parte, dado el papel del jabalí como reservorio de la enfermedad, y su elevado contacto con la ganadería porcina extensiva, es de gran interés el análisis de estas poblaciones para el control de la enfermedad.

En la actualidad, INGENASA participa en el proyecto europeo WildTBVac, con el objetivo de desarrollar, entre otros, ensayos para detección de tuberculosis en cerdos.

ENSAYO INDIRECTO para detección de IgG

INGENASA ha desarrollado un ELISA Indirecto que utiliza como antígeno las proteínas recombinantes MPB83 y MPB70. Para su validación, se han utilizado 1.500 sueros negativos y positivos de diferentes orígenes, tanto de cerdo como de jabalí, mostrando una sensibilidad y especificidad del 90 y 99,2%, respectivamente.

ELISA DE CAPTURA PARA LA DETECCIÓN DE IgG E IgM

La posibilidad de detectar de forma diferencial IgMs e IgGs producidas en respuesta a una infección es de vital importancia a la hora de controlar una enferme-



dad. INGENASA está desarrollando un ensayo de detección diferencial con este objetivo. En dos estudios realizados con infecciones experimentales con *M. bovis* en cerdo, resultados preliminares han demostrado que las IgMs son prácticamente indetectables pasados dos meses de la infección. Este dato, combinado con otros tipos de estudios epidemiológicos, de movimientos de animales, áreas de concurrencia, etc., puede ser de inestimable ayuda para conocer cuándo, dónde, cómo y por qué se producen las infecciones y así poder actuar en consecuencia.



08

APROXIMACIÓN A UN ENSAYO DIVA PARA EL VIRUS WEST NILE

**B. Rebollo¹, S. Lecollinet², A. Camuñas¹, E. Soria¹,
M.A Jiménez-Clavero³, C. Gallardo³, A.J Sanz¹ y A. Venteo¹**

¹Inmunología y Genética Aplicada, S.A. (INGENASA), Madrid, España.

²Animal Health Laboratory (ANSES), EU on equine West Nile disease, France.

³Centro de Investigación de Sanidad Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA)

El diagnóstico de la infección por el virus de West Nile se realiza actualmente a través de diferentes herramientas, siendo las más comunes la RT-PCR y los ensayos indirectos de detección de anticuerpos (seroneutralización y ELISAs para la detección de IgM/IgG). En la última década se han detectado varios brotes de West Nile en diferentes partes de Europa, lo que ha aumentado el número de vacunaciones de caballos en muchos países. Los métodos diagnósticos actuales no permiten diferenciar animales vacunados de infectados. El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un ensayo DIVA en base a la diferencia de respuesta humoral de los animales infectados y vacunados contra la proteína estructural E y la no estructural NS1. El ensayo diseñado es un ELISA indirecto en el que las proteínas virales E y NS1 son capturadas por anticuerpos monoclonales específicos. Para el estudio se utilizaron diferentes grupos de muestras: a) animales experimentalmente infectados y/o vacunados, sangrados a diferentes días y b) animales vacunados e infectados de campo. Los animales infectados y vacunados experimentalmente mostraron un nivel de anticuerpos muy alto contra la proteína E, mientras que la respuesta contra la proteína NS1 fue muy alta en los infectados pero muy baja en vacunados. Este mismo tipo de respuesta diferencial se observó en sueros de campo con historia clínica conocida. Por último, el análisis de un amplio grupo de sueros negativos para West Nile no mostró reactividad contra ninguna de las proteínas. Aunque son necesarios más estudios, los resultados preliminares de este trabajo parecen indicar que este ensayo es capaz de diferenciar caballos infectados de vacunados.



09

EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FASE AGUDA HAPTOGLOBINA A NIVEL SISTÉMICO Y LOCAL MEDIANTE RT-qPCR E INMUNODIFUSIÓN RADIAL EN CABALLOS CON PATOLOGÍA ARTICULAR AGUDA

**Laura Barrachina, Ana Rosa Remacha, Lourdes Soler,
Antonio Romero, Francisco José Vázquez, Arantza Vitoria,
María Ángeles Álava, Fermín Lamprave y Clementina Rodellar**

LAGENBIO-Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal,
Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. Servicio de Cirugía
y Medicina Equina, Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HVUZ),
España. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular,
Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, España

Los problemas articulares tienen gran relevancia en la especie equina. Existen diversas herramientas para diagnosticar las patologías articulares y valorar su evolución, siendo el análisis del líquido sinovial (LS) de especial interés. La determinación de mediadores de la inflamación, tanto a nivel local como sistémico, puede aportar mucha información. El uso de las proteínas de fase aguda (PFA) como biomarcadores de inflamación, infección y trauma ha cobrado relevancia en medicina veterinaria. Las PFA se caracterizan por cambiar su concentración durante el proceso inflamatorio, siendo los cambios de más o menos intensidad y duración. El Amiloide sérico A (SAA) se considera en el caballo la PFA mayoritaria, incrementando cientos de veces sus niveles basales durante la respuesta inflamatoria. Los incrementos del SAA son rápidos y breves, por lo que es necesario poder contar con otras PFA de respuesta moderada y más prolongada. Este sería el caso de la Haptoglobina (Hp). Sus niveles se han determinado a nivel sérico en la especie equina en distintas situaciones, sin embargo, existen muy pocos datos sobre su concentración basal en el LS y no hay trabajos que describan los niveles de Hp en el LS inflamatorio. En el presente trabajo se ha valorado la dinámica de la Hp en suero y LS equino utilizando un modelo de artritis aséptica. Se ha evaluado la expresión génica y la concentración de Hp en LS y sangre mediante RT-qPCR e inmunodifusión radial. Se ha visto una tendencia similar entre la expresión génica y la concentración de Hp en ambos



tipos de muestras, manteniéndose altos los valores hasta 15 días después de la lesión. Los rangos de Hp en suero y LS están significativamente relacionados, siendo proporcionalmente mayor el incremento de Hp en el LS. Estos resultados indican la utilidad de Hp como marcador inflamatorio en el caballo, muestran la dinámica de Hp a nivel local y sistémico y proporcionan rangos de referencia durante un proceso articular agudo.



10

APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE LA DISPERSIÓN DE LA CROMATINA PARA LA VALORACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS MSCs CANINAS EN USOS TERAPÉUTICOS

Ana Rosa Remacha¹, Laura Barrachina¹, Rosa Roy², Carmen López-Fernández², Jaime Gosálvez² y Clementina Rodellar¹

¹LAGENBIO-Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. ²Departamento de Biología, Unidad de Genética, Universidad Autónoma de Madrid, España

Las células madre mesenquimales (MSCs) representan una excelente herramienta para el tratamiento de patologías oculares (POs). Debido a este potencial, se están realizando ensayos en la especie canina que en un futuro se podrían extrapolar a las mismas patologías en humanos. La aplicación de las MSCs en POs está cobrando una notable importancia, debido a las características de auto-renovación, diferenciación a múltiples linajes e inmunomodulación que presentan estas células. Las propiedades de las MSCs se analizan *in vitro* como paso previo a la implantación en el paciente. El objetivo de estos análisis es conocer la información de las células, para decidir antes del tratamiento cuál es el mejor donante, así como el tipo celular y la dosis en función de la patología. Para ello, se deben establecer métodos rápidos de monitorización de las células durante todos estos procesos, incluso antes de implantar las MSCs en el paciente. Uno de los posibles métodos que se podría establecer como rutinario, debido a su facilidad de uso, de interpretación y rapidez, es la medida del daño en el DNA nuclear utilizando el método de dispersión de la cromatina celular. Esta técnica se basa en la observación de las modificaciones en la integridad del DNA de la célula tras un proceso de desproteinización controlada. Cualquier cambio en la integridad del DNA de las células podría tener efectos relevantes en las capacidades de las MSCs, comprometiendo su viabilidad o su potencial de regeneración y de inmunomodulación. Por ello, se ha utilizado el método de valoración del daño del DNA, para monitorizar el estado de las MSCs desde el momento de la extracción hasta el momento de implantación de las células en el paciente. Con el fin de conocer los posibles efectos de este daño en la viabilidad celular, se ha analizado el ratio Bax/Bcl-2 mediante RT-qPCR, para evaluar la muerte por apoptosis. Durante todo este proceso se puede ver cómo el daño celular producido por los procesos de extracción y cultivo de las MSCs se va estabilizando, hasta llegar a la infiltración en el paciente donde no se encuentra un porcentaje significativo de células con daño del DNA.



11

EVALUACIÓN DE DOS KITS ELISA COMERCIALES PARA LA DETECCIÓN RUTINARIA DE ANTICUERPOS FRENTE A *Erysipelothrix rhusiopathiae* EN CERDOS

A. Sánchez-Matamoros, M. Blanch, A. Camprodon, R. Sogaard y J. Maldonado

HIPRA, Amer, Girona, España. HIPRA DANMARK, Kolding, Dinamarca

El mal rojo (MR) es una enfermedad bacteriana causada por *Erysipelothrix rhusiopathiae* que provoca importantes pérdidas económicas en la producción porcina (Wood, 1984). Actualmente, la herramienta más eficaz para el control de la enfermedad es la vacunación masiva (Wang y cols. 2010), por el desarrollo de anticuerpos que generan una respuesta inmune protectora (Shimoji, 2000). Sin embargo, en los últimos años han sido notificados diversos fallos vacunales (Imada y cols. 2004; y Eamens y cols. 2006).

Para evitar estas situaciones, la correcta inmunización de los animales debe ser verificada por métodos serológicos que permitan valorar la seroconversión en los animales vacunados. El objetivo de este estudio es comparar los dos únicos kits ELISA disponibles en el mercado europeo, en cuanto a su capacidad para evaluar la inmunización de animales vacunados con diferentes vacunas comerciales frente a MR.

Un total de 277 muestras de suero de cerdos con estatus sanitario de MR conocido (indemnes, vacunados con 5 vacunas, infectados de manera natural y experimentalmente) fueron evaluados para determinar la presencia de anticuerpos frente a *E. rhusiopathiae* mediante dos kits: ELISA 1 (CIVTEST® SUIS SE/MR; HIPRA) y ELISA 2 (Ingezim Mal Rojo 1.1.MR.K1; Ingenasa). Los resultados se compararon mediante diferentes tests estadísticos, así como específicamente la seroconversión en los animales vacunados.

Los resultados obtenidos mostraron una gran similitud entre los dos kits. Ambos permitieron la detección y cuantificación de anticuerpos frente a *E. rhusiopathiae* con alta sensibilidad y especificidad, mostrando una concordancia casi completa ($\kappa = 0.97$) y una fuerte correlación positiva entre los resultados ($\rho = 0.856$).



Los dos kits permitieron además evaluar la seroconversión en los animales vacunados con una concordancia substancial ($\kappa = 0.65$) y fuerte correlación positiva ($Rho = 0.717$).

Los resultados de este estudio permiten afirmar que la serología rutinaria de MR realizada en las condiciones descritas es útil para valorar la inmunización de cerdos tras la vacunación con las vacunas comerciales, así como el estado inmunológico de poblaciones porcinas.



12

DIAGNÓSTICO E INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS EN AVES SILVESTRES, EXÓTICAS Y DE CORRAL

**C. Blanco¹, O. Alarcia⁴, I. A. Sevilla³, E. Molina³, C. Pérez-Martínez¹,
A. Balseiro² y J. F. García Marín¹**

¹Dpto. Sanidad Animal (Anatomía Patológica), Universidad de León. ²Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Área de Sanidad Animal, Centro de Biotecnología Animal, Deva, Gijón, Asturias. ³Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-Tecnalia), Derio, Vizcaya, País Vasco.

⁴Medio Ambiente, Junta de Castilla y León

Se estudió la incidencia de tuberculosis aviar en aves de corral, silvestres y exóticas y la micobacteria implicada. Para ello, se analizaron 242 aves procedentes del archivo del Servicio de Diagnóstico de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de León entre 2005 y 2014 y 257 muestras de hígado de aves silvestres remitidas por los Servicios de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León. Las muestras se dividieron en 3 categorías para su estudio: aves silvestres (n=332), aves de corral (n=118) y aves exóticas y de compañía (n=49). Se observaron lesiones tuberculosas macroscópicas y microscópicas en 12 aves (6 de corral y 6 silvestres). Mediante la técnica de la PCR en secciones de tejido incluidas en parafina, todas fueron negativas a micobacterias del Complejo *M. tuberculosis* y positivas a *M. avium*/intracellulare (IS901), diez de ellas también se estudiaron mediante RT-PCR mediante la amplificación de las secuencias IS1245, IS901 y FR300 (región flanqueante de la IS901), siendo todas identificadas como *M. avium* subsp. *avium* y negativas a *M. avium* subsp. *hominissuis*. Entre las aves tuberculosas cuatro de ellas fueron buitres, de un total de 93 analizados, mostrando 3 de ellos formas generalizadas de TB, siendo un hallazgo inusual y destacando la sensibilidad a la tuberculosis de esta especie. La distribución de lesiones en los 7 casos de necropsias completas de aves tuberculosas confirmó al hígado como el órgano afectado habitualmente en formas clásicas de tuberculosis, proponiéndose como la muestra de elección a tomar en estudios de campo. Las técnicas anatomopatológicas y de PCR en secciones histológicas mostraron una elevada eficacia en el diagnóstico de la TB aviar. Asimismo, fue destacable la elevada incidencia de tuberculosis observada en este trabajo comparada con otros previos, especialmente en aves de corral en estrecho contacto con humanos, lo



que implica una mayor importancia en su papel como zoonosis. Finalmente, la presencia en este estudio de tuberculosis exclusivamente en aves carroñeras y depredadoras, a diferencia de otros realizados con anterioridad, indicaría la posible transmisión por ingestión de otras aves infectadas.



13

NECROSIS HEPÁTICA AGUDA EN PERROS CARLINOS

**M.J. García-Iglesias¹, J.M. Meana-Busto², Elena Gayo¹,
C. Pérez-Martínez¹ y J.F. García-Marín¹**

¹Anatomía Patológica, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. ²Clínica Veterinaria Cavadonga, Asturias, España

Se presenta el diagnóstico de la causa de muerte de dos perros (hembra y macho), y presencia de enfermedad grave en otros dos, de raza Carlino con edades entre 2-7 años, sin relación genética y que vivían en la misma casa, con una dieta muy rica en zanahorias y aceite de hígado de bacalao y administración de ácidos grasos omega -3 y -6 y vitamina A. Todos presentaron clínica aguda, muriendo los dos primeros perros a las pocas horas, la hembra tras la realización de una ovariopexia y el macho tras su vacunación con vacuna pentavalente y frente a *Bordetella bronchiseptica* y parainfluenza. Se realizó la necropsia completa y estudios histopatológicos de este último y se estudiaron solo secciones histológicas de hígado y fotos macroscópicas en el caso de la hembra. En ambos se observó una necrosis hepática aguda panlobulillar y difusa con un número elevado de células de Ito, la presencia de hemoperitoneo y de múltiples hemorragias en serosas, así como hipoplasia adrenal. Los otros dos animales sufrieron un cuadro de hipersensibilidad aguda tras la vacunación, remitiéndose el cuadro clínico tras el tratamiento. La lesión hepática aguda observada ha sido asociada por otros autores a la intoxicación por acetaminofén (paracetamol) y a la administración subcutánea de la vacuna frente a *Bordetella bronchiseptica* y parainfluenza canina. El análisis toxicológico fue negativo a paracetamol y muy positivo a retinol y sus metabolitos, resultados que concuerdan con la demostración histopatológica en el hígado de las células de Ito. La sensibilidad individual (hipoplasia adrenal), y sobre todo la dieta, estarían involucrados en la presentación de la lesión hepática y en la muerte o clínica grave de los perros. La administración de la vacuna o la ovariopexia podrían ser el desencadenante de la grave lesión hepática favorecida por una alimentación incorrecta. Así mismo, la hipoplasia adrenal podría haber contribuido a una escasa respuesta al estrés y shock.



14

ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE LA ARTRITIS-ENCEFALITIS CAPRINA EN ANDALUCÍA

**Belén Barrero-Domínguez¹, Jaime Gómez-Laguna²,
Alfonso Maldonado¹, Anna Bindemann³, Manuel Sánchez⁴,
Rocío Jiménez⁴ y Rafael J. Astorga¹**

¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. ²Centro Tecnológico de Investigación y Calidad Agroalimentaria del Valle de Los Pedroches (CICAP), Córdoba. ³Inmunología y Genética Aplicada, S.A. (INGENASA), Madrid. ⁴Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

Este estudio se encuadra en el contexto del proyecto “CAPRITEC” (Convocatoria FEDER-INNTERCONECTA, 2013), cuyo objetivo ha sido la optimización del sector caprino en Andalucía mediante la tipificación de granjas y la mejora de los parámetros sanitarios y productivos.

La Artritis Encefalitis Caprina (CAE) es una enfermedad vírica (Retroviridae) que afecta principalmente a animales adultos (poliartritis crónica), y en ocasiones a animales jóvenes (signos nerviosos). En nuestro país existen pocos estudios de seroprevalencia centrados en su mayoría en otras áreas geográficas (Sánchez y cols., 2011, Martínez-Navalón y cols., 2013). Por ello, realizamos una investigación con el objetivo de conocer la frecuencia de infección por CAE en rebaños de Andalucía.

Para ello, se recogieron un total de 4.173 sueros de cabras de las razas Murciano-Granadina (MG), Florida (F) y Malagueña (M) procedentes de 48 rebaños ubicados en diferentes zonas geográficas de Andalucía: Sierra Morena, Valle del Guadalquivir y provincia de Málaga. Los sueros fueron analizados mediante un kit ELISA (Ingezim Maedi Screening, Ingenasa), con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 99,9%. La seroprevalencia total de animales infectados fue del 18,40% (IC95 17,23-19,58): 27,45% (MG), 18,10% (F) y 16,91% (M), observando diferencias significativas entre estas razas ($p = 0.05$). Dentro de las granjas afectadas, el porcentaje medio de animales positivos fue del $20,82\% \pm 24,07$. La prevalencia intragranja se distribuyó de la siguiente forma: 23 granjas con prevalencia inferior al 10% (47,91%), 19 granjas entre el 10 y el 50% (39,59%) y, finalmente, 6 granjas con una frecuencia superior al 50% (12,50%).



15

INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE PAVOS CON EL VIRUS BAGAZA. IMPLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO DE FLAVIVIRUS

**Rubén Villalba Martínez, Elena San Miguel Ibáñez,
José Ignacio Varo Jiménez, María José Ruano Ramos,
Manuel Durán Ferrer y Montserrat Agüero García**

Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) - Ministerio de Agricultura,
Pesca y Alimentación

La distribución geográfica de diversos Flavivirus se ha incrementado en los últimos años en diferentes partes del mundo. En este contexto, en septiembre de 2010 en el Laboratorio Central de Veterinaria (LCV), Laboratorio Nacional de Referencia para zoonosis víricas transmitidas por artrópodos, fue detectado por primera vez en Europa el virus Bagaza (BAGV), asociado con una inusual mortalidad de perdices y faisanes en el sur de España. En ese momento en el LCV se desarrolló una RT-PCR específica para la detección de BAGV con fines de vigilancia. Por comparación de toda la secuencia del genoma se ha confirmado que BAGV es la misma especie que el virus de la Meningoencefalitis del pavo en Israel (ITV), un virus patógeno que afecta esta especie. En el LCV se ha llevado a cabo la infección experimental de pavos macho con el BAGV aislado en 2010. El objetivo principal de esta experiencia fue valorar si el BAGV aislado en España puede producir la enfermedad en pavos y determinar la mortalidad y morbilidad de BAGV en esa especie, en condiciones experimentales. Otro objetivo ha sido evaluar la vía de transmisión por contacto directo, manteniendo un grupo de animales sin infectar y en contacto con un grupo infectado. La aparición de signos clínicos y aumento de la temperatura, junto con la detección de genoma del virus en sangre, hisopos, plumas y en diversos órganos de los animales sacrificados, confirman la reproducción de la patología en pavos. A pesar de ello, en esas condiciones experimentales, no se produjo mortalidad en los grupos infectados. Tampoco hubo evidencias de transmisión por contacto. En los grupos infectados se detectaron anticuerpos específicos frente a BAGV por seroneutralización. Actualmente, se están llevando a cabo ensayos con estos sueros para valorar la presencia de posibles reacciones cruzadas en el diagnóstico de la Fiebre del Nilo occidental (ELISA y seroneutralización).



16

DISEÑO, CALIBRADO Y VALIDACIÓN DE ESTRATEGIAS DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS MICROBIANOS

**Antonio Martínez-Murcia^{1,2}, Aaron Navarro², Gema Bru²
y Lyudmila Korenyuk²**

¹Universidad Miguel Hernández. ²Genetic PCR SolutionsTM, Elche, Alicante

La determinación de patrones genéticos ha transformado las bases de la clasificación de microorganismos y las técnicas de diagnóstico basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se implantan por su precisión, su sensibilidad y la rapidez de sus resultados. Sin embargo, el diseño de estrategias de PCR para la detección de microorganismos requiere de puntos de vista acordes con la enorme diversidad que deriva del singular modo de evolución procariota, según se refleja en las filogenias descritas. La especificidad de los cebadores (“primers”) y la de las sondas (“probes”, en el caso de PCR a tiempo real -qPCR) queda muy comprometida con la necesidad de cumplir unos requisitos termodinámicos mínimos que aseguren una PCR robusta y capaz de alcanzar una validación sujeta a consenso, por ejemplo, siguiendo los estándares de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025. El ensayo debe ser capaz de detectar toda la diversidad genética del patógeno diana (ensayo inclusivo) y distinguir éste del resto de secuencias de otros organismos distintos (exclusivo). El diseño “in silico”, conforme a lo descrito hasta la fecha, suele ser una buena aproximación siempre que evitemos algunos problemas de calidad en las bases de datos públicas. La validación de la especificidad “in vitro” se ha de realizar usando cultivos puros, colonias aisladas, de cepas “bona-fide”, necesariamente clasificadas mediante análisis filogenético. El estudio estadístico de curvas de calibrado construidas mediante ensayos qPCR con diluciones decimales seriadas de un DNA molde estándar nos permite establecer su eficiencia (amplificación realmente exponencial), su robustez en todas las concentraciones (coeficiente R²) y su fiabilidad mediante la determinación de la repetitividad y la reproducibilidad. El establecimiento de los límites de detección y cuantificación, también reproducibles, está muy ligado a los métodos de concentración de la muestra (comprometido con la presencia de inhibidores de la PCR) y los de extracción/purificación del DNA/RNA, que continúan siendo las principales causas de pérdida de la muestra. Precisamente, tan elevada sensibili-



dad le convierte en una tecnología extremadamente susceptible a falsos positivos por contaminación cruzada de las muestras y/o de los reactivos componentes de la PCR y residuos celulares no-viables. En consecuencia, resulta imprescindible incorporar diversos controles de reacción y someter el ensayo a estrictos sistemas de calidad.

“Part of the research shown has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under Grant agreement no: 311846.”



17

MEJORA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA NEUMONÍA BACTERIANA BOVINA CAUSADA POR *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni*

L. Valls, Mireia Blanch, S. Casademunt y J. Maldonado

HIPRA, Amer, Girona, España

Mannheimia haemolytica (Mh) e *Histophilus somni* (Hs) son las dos principales bacterias causantes de neumonía bovina (NB), de gran impacto en el ganado de carne. Su diagnóstico se basa en el aislamiento e identificación a partir de pulmón. Este método se ve limitado por el estado de conservación de la muestra, las condiciones de cultivo, la variabilidad fenotípica, etc. El objetivo de este trabajo es desarrollar un método alternativo que permita solucionar las principales limitaciones de la bacteriología convencional para el diagnóstico de la NB causada por Mh y Hs.

Se empleó un sistema (PulmorespFTA®) basado en la detección de Mh e Hs en hisopados pulmonares inoculados en tarjetas FTA, mediante un protocolo de PCR previamente descrito, adaptado al sistema en tiempo real utilizando metodología SYBR-Green (SYBR-Green RT-PCR). La fase de validación incluyó: 1) Especificidad analítica: se analizaron 28 cepas de virus y bacterias distintas. 2) Medidas comparativas de sensibilidad analítica, límite de detección, eficiencia y estabilidad del DNA. Se utilizaron diluciones seriadas de cepas de referencia tituladas de Mh e Hs. 3) Sensibilidad diagnóstica: se analizaron mediante bacteriología y SYBR-Green RT-PCR un total de 27 pulmones bovinos con neumonía. La SYBR-Green RT-PCR se realizó en suspensiones de tejido simultáneamente en su forma líquida, así como fijadas en tarjetas FTA.

Las dos PCRs mostraron valores del 100% de especificidad analítica, con límites de detección de 23,6 y 15,6 fg/μl de DNA, y eficiencias de 104 y 98.2% para Ms e Hs, respectivamente. Los valores de sensibilidad analítica para Mh e Hs fueron de 3×10^2 y 3,12 UFC/ml, respectivamente, tanto en muestra fresca como en muestra inoculada en tarjetas FTA. El material genético demostró ser estable en tarjetas FTA durante al menos 2 meses a temperatura ambiente. El 29,6% de los pulmones fueron positivos a Mh tanto en suspensión líquida como fijada en tarjeta FTA,



mientras que para Hs lo fueron el 18,5 y 7,4%, respectivamente. La detección de Mh e Hs mediante cultivo bacteriano fue del 11 y 0%, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que PulmorespFTA® puede ser una herramienta útil en el diagnóstico postmortem de dos de las principales bacterias causantes de neumonía bovina, superando limitaciones de la bacteriología convencional. La posibilidad de conservar las muestras fijadas por un largo tiempo y sin necesidad de refrigeración mejora la posibilidad de envío al laboratorio.



18

DIAGNÓSTICO DE BHV1gE: NUEVAS SOLUCIONES Y MEJORA EN LA SENSIBILIDAD DE LA DETECCIÓN DE LECHE DE TANQUES

**C. Schroeder, C. Engemann, S. Hennart, O. Sasse, B. Bürger
y Montserrat Enjuto**
Werfen y QIAGEN

La rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), causada por el Herpesvirus Bovino 1 (BHV-1), es una enfermedad del ganado tanto doméstico como salvaje. El virus está distribuido ampliamente por todo el mundo. La infección se ha erradicado ya en varios países europeos y tanto la erradicación como los programas de control se están realizando en muchos países. La menor sensibilidad de algunos kits de ELISA para la detección de IBR-gE es una de las desventajas de los programas de control de IBR basados en las vacunas marcadas. Es por ello que, en general, no se recomiendan los ELISAs IBR-gE para la detección en leche de tanque o de “pools”. El objetivo de este estudio fue comparar la sensibilidad del nuevo kit de ELISA: cattletype BHV1gE ELISA con el kit HerdCheck IBRgE ELISA y evaluar el kit “cattletype milk prep” para la concentración y purificación de anticuerpos de la leche y su efecto en la mejora de sensibilidad de los kits de ELISA IBR-gE con muestras de leche de tanque o de “pools” de leches.

El kit ELISA “cattletype BHV1gE ELISA kit” detectó todas las muestras de referencia de suero y de leche de un panel de muestras de referencia del laboratorio de referencia alemán FLI. El ensayo tuvo la misma sensibilidad que el kit HerdCheck IBRgE, del 93,2%, basándose en el estudio de 249 sueros de ganado positivo para BHV1. Sin embargo, cuando se analizaron 2.985 muestras de animales vacunados con vacuna IBR marcada, pero no infectados, el kit cattletype BHV1gE tuvo el 100% de especificidad comparada con el 99,2% del kit HerdCheck. Debido a la elevada sensibilidad y excelente especificidad del kit cattletype BHV1gE ELISA kit es uno de los dos únicos kits de ELISA IBRgE que han pasado el proceso de registro oficial en Alemania. Una vaca IBR-gE positiva puede ser detectada en un “pool” de 49 muestras de leche negativas, sin purificación ni concentración de los anticuerpos. El proceso de concentración y purificación de la leche mejora la sensibilidad entre el 5,4 y el 75,7% en el ganado positivo. Las muestras de



leche con una señal positiva fuerte o moderada se detectan mejor tras el proceso de concentración. Tras un estudio analizando mensualmente muestras de tanques de leche de rebaños vacunados con vacuna marcada IBR-gE, y negativos para la infección, durante siete meses, los resultados fueron siempre negativos. Los resultados cuando las muestras de los tanques de leche fueron de ganado con < 5% de vacas positivas para IBR-gE siempre fueron positivos tras la concentración de las muestras con el kit.

QIAGEN ha desarrollado los kits cattletype BHV1gE ELISA y cattletype milk prep kit para mejorar el diagnóstico y la detección de la infección por BHV1 en suero, leche y muestras de tanque de leche.



19

APLICACIÓN DE LA METAGENÓMICA AL ESTUDIO DE LA PARATUBERCULOSIS

Rakel Arrazuria, Ramón A. Juste y Natalia Elguezabal

Departamento de Sanidad Animal, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-Tecnalia), Derio, Vizcaya, País Vasco

La metagenómica se define como el estudio del conjunto de genomas de un entorno determinado. Gracias al desarrollo de la secuenciación masiva, y a su abaratamiento, se ha podido aplicar esta tecnología al estudio del papel de la microbiota en el desarrollo de ciertas enfermedades. La dieta puede producir cambios en la microbiota que son capaces de modular el curso de la infección, confiriendo cierto grado de protección o facilitando el avance de la infección. En el presente estudio hemos utilizado la metagenómica para el estudio de la microbiota digestiva en conejos infectados experimentalmente con *Mycobacterium avium* subespecies paratuberculosis (MAP) y alimentados con diferentes dietas durante el desafío. Para ello se realizaron dos experimentos, en el primero todos los animales infectados y no infectados con MAP ($n=5/\text{grupo}$) tomaron una dieta regular. En el segundo experimento se realizó un cambio de la dieta regular por una dieta alta en fibra en el momento del desafío tanto en el grupo de infectados como el de no infectados ($n=5/\text{grupo}$). En la necropsia se tomaron muestras de contenido cecal y sáculo. Tras la extracción del ADN se realizó la secuenciación del 16s DNAr empleando la plataforma de secuenciación masiva Miseq (Illumina). El análisis de datos se llevó a cabo siguiendo el protocolo del software libre QIIME. Se observaron diferencias cualitativas en la composición microbiana en el ciego de animales infectados y no infectados ($p=0,01$). En el sáculo se observaron diferencias cualitativas ($p=0,032$) y cuantitativas ($p=0,048$) entre animales infectados y no infectados. Entre los grupos taxonómicos asociados con la infección se detectaron algunos que independientemente del tejido o dieta mostraban la misma asociación con la infección por MAP. Sin embargo, otros grupos taxonómicos mostraron asociación tanto positiva como negativa con la infección por MAP dependiendo del tejido y/o la dieta. Este estudio abre la puerta a la utilización de grupos taxonómicos como marcadores de infección y al estudio metabólico que los cambios observados podrían implicar.



20

DESARROLLO DE UN ELISA TIPO SÁNDWICH PARA LA DETECCIÓN ESPECÍFICA DE LA “NUEVA VARIANTE” DEL RHDV

Rosa Casais¹, Kevin P. Dalton², Roxana González¹, Inés Nicieza², Ana Podadera², Daniel del Llano², José Manuel Martín Alonso², José Miguel Prieto¹ y Francisco Parra²

¹Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Asturias. ²Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo, Asturias

En 2011 se detectaron varios brotes atípicos de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHD, del inglés Rabbit Haemorrhagic Disease) en granjas comerciales españolas. El aumento progresivo de los casos atípicos llevó a la investigación del agente causal de la enfermedad, detectándose la presencia de una “nueva variante” del virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos (RHDV) que se ha denominado RHDVb. Dada la extensión en los últimos años de esta variante por toda la Península Ibérica se requiere la aplicación de medidas de control efectivas y específicas. En la actualidad no existe ningún ELISA comercial disponible específico para la detección de RHDVb. En este sentido, se ha desarrollado un método de diagnóstico que consiste en un ELISA tipo sándwich, diseñado para la detección específica de antígeno de RHDVb en homogeneizados de hígado. El ensayo consiste en el tapizado de la placa ELISA con un anticuerpo monoclonal (AcM) específico frente a la nueva variante, la incubación con la muestra y la detección del antígeno viral con un suero policlonal de cabra anti-RHDVb y proteína G- γ peroxidasa. La especificidad y la sensibilidad del ELISA se estimaron mediante el análisis de 71 muestras (13 negativas, 17 positivas a RHDV clásico y 41 positivas a la nueva variante), clasificadas utilizando como técnica de referencia la secuenciación del producto de una RT-PCR convencional capaz de detectar cualquier aislado de RHDV. Nuestro estudio demuestra que el ELISA desarrollado es una herramienta de diagnóstico útil, capaz de detectar específicamente conejos infectados con la nueva variante con una especificidad del 100%, una sensibilidad del 93% y un alto grado de repetibilidad.

Trabajo financiado mediante los proyectos E-RTA13-00044-00-00 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), el proyecto AGL2013-48550-C2-1-R del Ministerio de Economía y Competitividad (FEDER) y el GRUPIN14-099 del Gobierno del Principado de Asturias.



21

EVALUACIÓN DE LA INTERFERENCIA DE LA VACUNA FRENTE A PTB EN EL DIAGNÓSTICO DE TB BOVINA EMPLEANDO DIFERENTES ANTÍGENOS

Miriam Serrano¹, J.M. Garrido¹, E. Minguijón¹, A. Urkiza², M.V. Geijo¹, I.A. Sevilla¹, N. Elguezabal¹, R. Arrazuria¹, P. Vázquez¹, M. Vordermeier³, P. Whelan³, R.A. Juste¹

¹Departamento de Sanidad Animal, NEIKER-Tecnalia, Bizkaia, ²Veterinario clínico, Bizkaia, ³Department of Bovine Tuberculosis. AHVLA. Surrey. UK

En estos momentos no se cuestiona el efecto beneficioso de la vacunación frente a paratuberculosis (PTB) para el control de la enfermedad. Sin embargo, en aquellos países en los que se lleva a cabo un programa de erradicación de tuberculosis (TB) su utilización no está permitida. Excepcionalmente dicha vacunación puede ser autorizada en circunstancias muy restringidas en zonas de especial incidencia de la PTB y ausencia documentada de TB.

En esta comunicación se presentan los resultados de un experimento en el que combinó la vacunación frente a PTB con la infección con *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Se analizó la respuesta inmune celular de los animales mediante cuantificación de la liberación de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con antígenos de diferentes especificidades: PPD (bovina y aviar), ESAT-6/CFP-10 y Rv3615c, así como mediante la prueba de la Intradermorreacción Comparativa (IDRc).

En el grupo no vacunado frente a PTB e infectado con *M. bovis* no hubo problema en el diagnóstico de la TB tal y como era de esperar. En el grupo vacunado pero no infectado a partir de la cuarta semana post-vacunación se pudo observar una respuesta predominantemente aviar a nivel de grupo. Inesperadamente en este grupo se observaron reacciones a la PPD-B a partir de la semana 18 en base a los resultados de IFN- γ , si bien no se encontraron lesiones en ninguno de los animales. El grupo más problemático fue el vacunado frente a PTB e infectado con *M. bovis* en el que, aunque a nivel de grupo se observaba el predominio de la respuesta a la PPD-B, a nivel individual el diagnóstico de TB era confuso con los antígenos tradicionales en muestreos sucesivos. Sin embargo, cuando se utilizaron los antígenos más específicos se observó que la vacunación no interfería



en diagnóstico de la TB tanto con el IFN- γ como con la IDRc. Por otra parte, tras las necropsias se confirmó que la mayoría de los animales vacunados e infectados mostraban una reducción tanto en la extensión de las lesiones tuberculosas como en la carga bacteriana de las mismas. Como conclusión, se puede decir que los resultados obtenidos con los antígenos tradicionales evidenciaban cierto grado de interferencia de la vacuna frente a PTB con el diagnóstico de TB, la cual desaparecía al utilizar los antígenos específicos. En la mayoría de los animales infectados se observó también cierto nivel de protección frente a TB asociado a la vacunación de PTB.



POSTERS





P01

NUEVA CITA PARA ESPAÑA DE *Culicoides paradoxalis* (Diptera: Ceratopogonidae). CARACTERES MORFOLÓGICOS DIFERENCIALES Y DINÁMICA ANUAL

**J. M. Sánchez Murillo¹, M. González², M. M. Martínez Díaz¹,
C. Sanz Jiménez¹, A. Reyes Galán¹ y P. M. Alarcón-Elbal³**

¹Laboratorio Regional de Sanidad Animal. Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Energía. Gobierno de Extremadura, España. ²Sand Fly Research Group, Faculty of Life Sciences, Keele University, UK. ³Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España

El número de especies de *Culicoides* citadas en España se ha incrementado notablemente desde principios del siglo XXI a raíz de la aparición de nuevos brotes del virus de la lengua azul tras un silencio epidemiológico de 40 años. Extremadura ha sido históricamente una de las regiones del país que se ha visto más severamente afectada por esta epidemia. Fruto del Programa Nacional de Vigilancia Entomológica frente a la Lengua Azul, se ha capturado por primera vez la especie *Culicoides paradoxalis* Ramilo & Delécolle, 2013 en Extremadura, gracias al estudio anatómico de 438 hembras y un macho capturados con trampas de luz mini CDC en tres localizaciones ganaderas, siendo éstas la cacereña Membrío y las pacenses Villanueva del Fresno y Valencia de las Torres. Este ceratopogónido había sido recientemente descrito por primera vez en Portugal y Francia, reportándose sus semejanzas morfológicas con *C. lupicaris* y *C. newsteadi*. Sin embargo, ciertos caracteres morfológicos permiten una identificación fehaciente de la misma, lo que es de gran importancia en cuanto a la determinación de la proporción exacta de vectores potenciales inequívocamente, más aún tratándose de una especie muy similar a otras del mismo subgénero de reconocido interés veterinario. A tenor de las capturas podría desempeñar su pico de actividad durante las semanas centrales del verano. Gracias a este descubrimiento, el número de especies presentes en España se incrementa a 82, mientras que en Extremadura se conocen 28 especies.



P02

DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE HABRONEMOSIS EN GANADO ASNAL (*Equus asinus* Linnaeus, 1758)

**José-Marín Sánchez Murillo¹, Juan Jesús Carrasco López²,
Vanesa Gómez-Arrones Egido², Javier Masot Gómez-Landero³
y Pedro María Alarcón-Elbal⁴**

¹Laboratorio Regional de Sanidad Animal. Gobex. ²Centro de Selección y Reproducción Animal (CENSYRA). Gobex. ³Departamento de Medicina Animal.

Facultad de Veterinaria de Cáceres. ⁴Departamento de Patología Animal.

Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

La habronemosis es una parasitosis producida por especies de los géneros *Haemonema* y *Draschia* (Spirurida, Habronematidae). Los primeros parasitan el estómago de los équidos, pudiendo ocasionar una gastritis catarral, mientras que los segundos dan lugar a la formación de grandes nódulos fibrosos también en el estómago. No obstante, su mayor significación patológica se debe a ciertas alteraciones cutáneas, produciendo las denominadas “heridas, úlceras o llagas de verano”. Sus huevos embrionados se eliminan con las heces y son ingeridos por los hospedadores intermediarios: larvas de moscas que se desarrollan en medios estercoleros y pertenecientes a los géneros *Musca*, *Stomoxys* y *Haematobia*. Las L-III infectantes se forman en la pupa de la moscas y se encuentran libres en el hemocele de los adultos, emigrando de esta forma a la probóscide. La L-III abandona la mosca cuando ésta se alimenta en los labios, orificios nasales y heridas cutáneas del hospedador vertebrado. En relación a nuestro hallazgo, del núcleo asnal estabulado en el Centro de Selección y Reproducción Animal (CENSYRA) de Badajoz, compuesto por 6 machos adultos aislados individualmente (entre 3 y 16 años) y 17 hembras reproductoras explotadas semiextensivamente, todos los machos y tan solo dos hembras presentaron lesiones cutáneas a nivel de las extremidades. Los resultados de la coprología llevada a cabo mediante la técnica de Mc.Master fueron negativos, no pudiendo observar en ningún momento los huevos larvados característicos de estos parásitos. Se procedió también a la realización de biopsias de la zona afectada en varios de los animales, que se conservaron en formol al 10%. Las muestras se procesaron con las técnicas y tinciones histopatológicas rutinarias, lo cual tampoco reveló la presencia de larvas en las mismas.



P03

ESTUDIO COMPARATIVO DE MOHOS Y MICOTOXINAS EN DOS VARIEDADES DE MAÍZ CON DIFERENTE NIVEL DE CAROTENOIDES DESTINADAS A PIENSO PARA AVES

**J. Díaz-Gómez^{1,2}, C. Nogareda², C. Zhu³, S. Marín¹, V. Sanchís¹
y A. J. Ramos¹**

¹Departamento de Tecnología de Alimentos; ²Departamento de Producción Animal; ³Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal, Universitat de Lleida, UTPV-XaRTA, Centro Agrotecnio, Lleida, España

La producción avícola utiliza carotenoides para mejorar la pigmentación de pollos y huevos. Las materias primas utilizadas en las formulaciones de piensos para pollos y gallinas, aunque tengan como base el maíz, no son capaces de proporcionar cantidades suficientes de carotenoides para alcanzar el nivel de pigmentación de la piel y de la yema deseado por los consumidores. Para solucionar este problema, la industria avícola utiliza pigmentos naturales o sintéticos como aditivos para piensos. La utilización de variedades de maíz transgénico enriquecido en carotenoides se presenta como una opción a los aditivos.

En la Universitat de Lleida (UdL) se ha generado un maíz transgénico fortificado en carotenoides (Ph3) mediante la transformación simultánea de tres vías metabólicas a partir de una variedad de maíz blanco sudafricano (M37W) carente de carotenoides. Este maíz produce altos niveles de β -caroteno, zeaxantina, luteína, licopeno, ácido ascórbico y folato, pero se desconoce si esta mejora genética puede afectar a otras características, como su susceptibilidad a la colonización fúngica y a la producción de micotoxinas.

Durante dos campañas consecutivas (2013 y 2014) se ha cultivado el maíz Ph3 y el M37W en un campo experimental de la UdL. La infección fúngica del grano recién recolectado no fue significativamente diferente entre las dos variedades durante las dos campañas estudiadas: en 2013 el porcentaje de infección fúngica fue del 90% en ambos tipos de maíz, mientras que en 2014 fue del 81 y 86% para el maíz Ph3 y el M37W, respectivamente. *Fusarium verticillioides* fue el principal moho aislado en ambas campañas, habiéndose observado una reducción de su presencia a favor de *Fusarium proliferatum* en la segunda cosecha del maíz



M37W. En ninguna de las dos campañas se detectaron especies de *Aspergillus* potencialmente aflatoxigénicas.

En cuanto al análisis de micotoxinas en el maíz, los niveles de fumonisinas encontrados fueron de 0,93 y 1,32 mg/kg (en 2013), y de 1,80 y 4,54 mg/kg (en 2014), para el maíz Ph3 y M37W, respectivamente, mientras que no se observó contaminación por aflatoxinas. Para poder discernir con mayor certeza la influencia del tipo de maíz en la contaminación final por micotoxinas, se van a repetir los ensayos durante más campañas.

Agradecimientos.- Los autores agradecen la financiación obtenida a través del Proyecto RecerCaixa PC084082, y de los proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) BIO2014-54441-P y AGL2014-55379-P. J. J. Díaz-Gómez agradece a la Universitat de Lleida la beca predoctoral.

**P04**

SEROTIPOS DE SALMONELA AISLADOS EN EL LABORATORIO REGIONAL DE SANIDAD ANIMAL DE LA COMUNIDAD DE MADRID EN EL PERÍODO 2009-2015

**Fernando Mirat Arellano, *Juan Ángel Díaz de Tuesta García,*
Almudena Ortiz Cuevas y María de Alba Ortega**

Laboratorio Regional de Sanidad Animal Comunidad de Madrid

Serotipos de salmonela aislados en la Unidad de Bacteriología del Laboratorio Regional de Sanidad Animal, en la Comunidad de Madrid en el periodo 2009-2015, organizados por matriz, origen animal o alimentos para animales, y por la frecuencia de cada uno. Con especial referencia a *Salmonella typhimurium* monofásica.



P05

PREVENCIÓN EFICAZ Y DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA (RHD) EN CONEJOS

**Sonsoles Pacho Jiménez, Félix García Garrido, Elías Dahdouh
y Mónica Suárez Rodríguez**

Departamento Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense, Madrid

La enfermedad vírica hemorrágica del conejo (RHD) es una enfermedad infecciosa que afecta a conejos adultos silvestres y domésticos con porcentajes de mortalidad que pueden llegar al 100%. Desde los años 80, esta infección ha causado graves problemas en las explotaciones cunícolas, ya que la entrada del virus producía la muerte de la mayor parte de ellos en un intervalo de tiempo inferior a las 96 horas. Afortunadamente, el desarrollo de vacunas eficaces frente a la RHD mantuvo los brotes bajo control hasta la aparición de una nueva variante del virus (RHDVb) en 2010. Este virus, que se transmite de forma tan rápida y virulenta como la variante clásica, afecta a los animales menores de 40 días causando la muerte en un par de días tras la infección. Por ello, esta enfermedad cobra una especial importancia de cara a productores cunícolas e investigadores.

Desde el punto de vista económico, esta enfermedad infecciosa supone un alarmante problema tanto para el sector ganadero, que se arriesga a ver desaparecer su fuente de ingresos en menos de una semana, como para el sector cinegético. No debemos olvidar, además, que la reducción de las poblaciones de conejos silvestres implica la disminución drástica de un elemento clave en la cadena alimentaria de muchos de los depredadores autóctonos en España, siendo especialmente preocupante en el caso del lince ibérico, debido a la limitada cantidad de ejemplares que se conservan en la actualidad.

Como solución al problema, existen ciertas vacunas en el mercado que se están utilizando de forma sistemática como método de prevención de la infección por RHDVb en gazapos. No obstante, sería de gran utilidad el desarrollo de un método diagnóstico rápido y fiable que permitiera la contención de los brotes en caso necesario, ya sea mediante el sacrificio o la vacunación de emergencia. En este trabajo presentamos un método diagnóstico efectivo mediante PCR a partir de tejido pulmonar, con resultados positivos tanto en la variante clásica como en la nueva variante de la enfermedad.



P06

***Clostridium perfringens* EN RESERVORIOS DE AGUA DEL ZOO-AQUARIUM DE MADRID: PREVALENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS**

**José L. Blanco¹, Sergio Álvarez-Pérez¹, Eva Martínez-Nevado²
y Marta E. García¹**

¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid. ²ZOO-AQUARIUM Madrid, Departamento Veterinario, Madrid

A pesar de la importancia de *Clostridium perfringens* (CP) como patógeno animal y agente productor de toxiinfecciones, aún se sabe poco sobre su distribución ambiental. En este estudio determinamos la prevalencia de CP en reservorios de agua del Zoo-Aquarium de Madrid. Se estudiaron un total de 24 reservorios de agua, los cuales se muestrearon por duplicado. Todos los aislamientos recuperados (1-5 por cultivo positivo) fueron toxinotipados mediante PCR múltiples que detectan los genes codificantes de las toxinas principales (alfa, beta, épsilon e iota), una enterotoxina (CPE) y la toxina beta 2 (CPB2). Además, se determinó la sensibilidad in vitro de todos los aislamientos frente a metronidazol (MTZ) mediante el método de dilución en agar, y de una selección de aislamientos (1 por muestra de agua positiva para CP) frente a otros 14 antibióticos mediante la técnica del Etest. CP fue encontrado en 12 de los 24 puntos de muestreo. Todos los aislamientos recuperados resultaron ser de tipo A y el 41.7% de ellos tenían el gen *cpb2*. No se detectaron resistencias frente a amoxicilina/clavulánico, clindamicina, daptomicina, enrofloxacin, eritromicina, ertapenem, moxifloxacin, levofloxacin, linezolid, penicilina, rifampicina, teicoplanina, tigeciclina y vancomicina. En cuanto al MTZ, 27 aislamientos (37.5% del total; 19 de ellas *cpb2*+) eran sensibles con CMI $\leq$ 8 mg/L, 41 (56.9%; 11 *cpb2*+) mostraron sensibilidad intermedia (CMI = 16 mg/L) y 4 (5.6%; todas *cpb2*-) eran resistentes (CMI $\geq$ 32 mg/L). Los aislamientos resistentes a MTZ procedían de 3 reservorios de agua diferentes: estanque externo de aves, principalmente flamencos; bebedero de cebras y avestruces; y estanque interno de nutrias gigantes. En conclusión, CP es altamente prevalente en los reservorios de agua analizados, lo cual supone un riesgo sanitario evidente.

Estudio financiado mediante el proyecto AGL2013-46116-R del Ministerio de Economía y Competitividad.



P07

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO A METRONIDAZOL DE AISLAMIENTOS DE *Clostridium perfringens* DE ORIGEN ANIMAL

**José L. Blanco¹, Sergio Álvarez-Pérez¹, Eva Martínez-Nevado²,
Cristina Orden¹, Rafael Astorga³ y Marta E. García¹**

¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid. ²ZOO-AQUARIUM Madrid, Departamento Veterinario, Madrid. ³Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

Uno de los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las infecciones por *Clostridium perfringens* (CP) y otros anaerobios es el metronidazol (MTZ). Sin embargo, la resistencia a MTZ es considerada un problema emergente en algunos importantes patógenos. Aunque la mayoría de aislamientos de CP de origen humano caracterizados hasta la fecha se muestran sensibles a MTZ, existen aún muy pocos datos al respecto en veterinaria. En este estudio determinamos mediante el método de dilución en agar la sensibilidad in vitro a MTZ de 70 aislamientos de CP de origen animal, principalmente porcino (55.7%) y canino (21.4%). Todos los aislamientos fueron además caracterizados mediante reacciones de PCR múltiple que detectan los genes codificantes de las 4 toxinas principales (alfa, beta, epsilon e iota), las cuales sirven para clasificar la especie en 5 toxinotipos (A-E), así como una enterotoxina (CPE) y la toxina beta 2 (CPB2). Veinte aislamientos (28.6% del total), todos de tipo A y 14 cpb2+, resultaron ser sensibles a MTZ (CMI $\leq$ 8 mg/L). Otros 46 aislamientos (65.7%), todos de tipo A y de los cuales 23 eran cpb2+ y 2 cpe+, presentaron una sensibilidad intermedia (CMI = 16 mg/L). Los 4 aislamientos restantes, 3 de tipo A (procedentes de una cebra, una gacela y un perro, todos cpb2-/cpe-) y uno de tipo B (de origen porcino y cpb2-/cpe-), mostraron resistencia a MTZ (CMI $\geq$ 32 mg/L). En conclusión, aunque la tasa de resistencia a MTZ en aislamientos de CP de origen animal es aún baja, el elevado porcentaje de aislamientos con sensibilidad intermedia debería llevarnos a replantear el amplio uso actual de este antibiótico en sanidad animal.

Estudio financiado mediante el proyecto AGL2013-46116-R del Ministerio de Economía y Competitividad.



P08
SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE AISLAMIENTOS
DE *Staphylococcus* DEL GRUPO “intermedius”
DE ORIGEN CANINO

**José L. Blanco¹, Sergio Álvarez-Pérez², Marta Pérez-Sancho³,
Carmen Martín¹, Lucas Domínguez³ y Marta E. García¹**

¹Hospital Clínico Veterinario, Universidad Complutense, Madrid. ²Departamento Sanidad Animal, Universidad Complutense, Madrid. ³Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, Madrid

Las especies de *Staphylococcus* del grupo “*intermedius*” (SGI) son los principales cocos coagulasa positivo implicados en patología veterinaria. En los últimos años se ha detectado un aumento en la prevalencia de cepas SGI resistentes a múltiples antibióticos y, en particular, a oxacilina. El objetivo de este estudio fue determinar los patrones de antibiorresistencia de una colección de aislamientos SGI procedentes de muestras clínicas de perros con diversas patologías. Se analizó un total de 45 aislamientos, de los cuales 40 (88.9%) fueron identificados como *S. pseudointermedius* (SP) y 5 (11.1%) como *S. intermedius* (SI) mediante la tecnología MALDI-TOF. Todos los aislamientos de SI y el 95% de los correspondientes a SP mostraron resistencia frente a alguno de los antibióticos analizados, y el 80 y 52.5%, respectivamente, fueron considerados multirresistentes (resistencia a > 2 clases distintas). Un 17.5% de los aislamientos de SP eran resistentes a oxacilina, con concentraciones mínimas inhibitorias (determinadas mediante dilución en agar) situadas en el rango de entre 4 y > 256 mg/L. Por el contrario, todos los aislamientos de SI se mostraron sensibles a oxacilina. Los porcentajes de aislamientos de SI y SP resistentes al resto de antibióticos analizados, en este caso mediante el método del disco, fueron los siguientes: amikacina, 0 y 5; cefoxitina, 20 y 22.5; ciprofloxacina, 20 y 27.5; claritromicina, 40 y 42.5; clindamicina, 40 y 42.5; cloranfenicol, 20 y 22.5; eritromicina, 40 y 45; gentamicina, 20 y 25; kanamicina, 60 y 50; linezolid, 0 y 0; norfloxacina, 20 y 22.5; ofloxacina, 20 y 25; penicilina, 100 y 85; rifampicina, 0 y 2.5; tetraciclina, 60 y 45; y trimetoprim-sulfametoxazol, 40 y 37.5. Estas elevadas tasas de resistencia vienen a destacar la importancia de realizar un análisis detallado de los aislamientos clínicos antes de establecer un tratamiento antibiótico frente a las infecciones causadas por miembros del SGI.



P09

INFLUENCIA DE LA CORTISOLEMIA SOBRE EL NÚMERO DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES EN YEGUAS CÍCLICAS PURA RAZA ESPAÑOLA

K. Satué¹, A. Calvo² y A. Muñoz³

¹Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad CEU-Cardenal Herrera, Valencia, España. ²Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales, Universidad Católica de Valencia-San Vicente Mártir, Valencia, España. ³Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria de Córdoba, Córdoba, España

Aunque la bibliografía ha documentado ampliamente que el incremento sostenido de la secreción de cortisol (CORT) en el caballo bajo determinadas situaciones estresantes como transporte, excitación, miedo, etc., induce neutrofilia (Robson y cols., 2003), en el campo de la reproducción, los estudios realizados hasta la actualidad han caracterizado exclusivamente el efecto de la cortisolemia sobre el número de neutrófilos (NFS) en yeguas gestantes Standardbred y árabes (Flisinska-Bojanowska y cols., 1992; Roberto da Costa y cols., 2003). Por este motivo el objetivo de este estudio fue analizar el efecto del cortisol (CORT) sobre el número de NFS circulantes durante las fases folicular (FF) y luteína (FL) en 24 yeguas cíclicas PRE. El número de NFS fue determinado mediante un contador hematológico (Celltac E MEK-7222 Nihon Kohden Europe), con verificación posterior a través de frotis sanguíneos, y las concentraciones séricas de CORT mediante RIA, previa monitorización del grado de crecimiento folicular vía ecografía transrectal. Aunque el estudio comparativo entre fases no mostró diferencias en los números absolutos de NFS (FF: $4,94 \pm 1,28$; FL: $4,85 \pm 1,39$ cél/ul), las concentraciones de CORT fueron significativamente superiores durante la FL ($87,68 \pm 10,71$ ng/dl; $73,20-102,1$) ($p < 0,05$). Las correlaciones entre el número de NFS y el CORT fue de $r = 0,12$. Los resultados de este estudio demuestran que aunque el CORT se ve afectado fisiológicamente por el periodo dominante del ciclo, su efecto sobre el número de NFS no es cuantitativamente significativo, por lo que en yeguas cíclicas el ciclo estral parece no influenciar en el estado inmunológico en la yegua PRE.



P10

VALORACIÓN DE LA GLUCEMIA, COLESTEROLEMIA Y TRIGLICERIDEMIA COMO MARCADORES DE RESISTENCIA A LA INSULINA EN YEGUAS LACTANTES PURA RAZA ESPAÑOLA

K. Satué¹, A. Calvo² y A. Muñoz³

¹Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Valencia, España. ²Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales, Universidad Católica de Valencia-San Vicente Mártir, Valencia, España. ³Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria de Córdoba, Córdoba, España

En yeguas de diversas razas, como PSI, Standardbred, árabes y ponies, principalmente en animales obesos, la lactación conduce a un descenso de la glucemia, trigliceridemia y colesterolemia (Harvey y cols., 2005, Aoki a Ishii, 2012). Esta respuesta se atribuye a la excreción de dichos metabolitos para la formación de los componentes lácteos a nivel de la glándula mamaria, conduciendo al mismo tiempo a un estado periférico de resistencia a la insulina (RI). La RI disminuye la absorción de glucosa (GLU) y favorece la acción lipogénica en el hígado, músculo y tejido adiposo, con producción de triglicéridos (TRIG), liberación de otras partículas de colesterol (COL) y por consiguiente al desarrollo de dislipemias. Hasta la actualidad estos mecanismos permanecen desconocidos en la yegua lactante PRE. Por este motivo, el objetivo de este estudio fue analizar los niveles de GLU, TRIG y COL durante los primeros 4 meses de lactación en 24 yeguas PRE. Las concentraciones plasmáticas de GLU, TRIG y COL fueron determinadas mediante espectrofotometría (Metrolab 2300 Plus). El estudio comparativo entre los meses de lactación no reveló variaciones en los niveles plasmáticos de dichos metabolitos, detectándose valores medios de GLU de $90,06 \pm 10,91$, $93,53 \pm 10,77$, $95,60 \pm 17,01$ y $95,22 \pm 16,03$ mg/dl, TRIG de $21,12 \pm 26,27$, $17,15 \pm 31,66$, $12,71 \pm 15,34$ y $12,09 \pm 14,84$ mg/dl y COL de $94,20 \pm 21,60$, $99,76 \pm 12,16$, $94,36 \pm 17,54$ y $100,8 \pm 12,61$ mg/dl, respectivamente. Los resultados de este estudio demuestra, a diferencia de otros estudios, que en yeguas PRE de condición corporal normal (Henneke 5/9) la lactación no garantiza un mecanismo fisiológico de resistencia a la insulina.



P11

**MICROBIOTA INTestinal EN RUMIANTES:
DESARROLLO DE NUEVOS PROBIÓTICOS**

**Félix García Garrido, Sonsoles Pachó Jiménez, Elías Dahdouh
y Mónica Suárez-Rodríguez**

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense, Madrid

Un problema sanitario de elevada importancia en las granjas de producción de rumiantes son las diarreas neonatales, ya que generan grandes pérdidas económicas, ya sea por las altas mortalidades en las primeras semanas de vida o por el retraso en el crecimiento de los animales (Sánchez Acedo y col.). La naturaleza de los agentes etiológicos es muy variada, pero entre los principales responsables se encuentran *E. coli*, rotavirus, coronavirus y criptosporidios, o generalmente la combinación de varios de ellos (S. Martín Gómez). Según diferentes estudios científicos realizados en terneros en los últimos años, el uso de probióticos, prebióticos y simbióticos está resultando efectivo en el tratamiento de diarreas, consiguiendo recuperaciones más rápidas y eficaces (R. Patel y H. Dupont). Nuestra investigación se centrará en la búsqueda de un probiótico que ayude a la recuperación de la microbiota intestinal de animales que padezcan diarrea o que la hayan sufrido recientemente, aunque en este caso trabajaremos con ganado ovino. En cuanto a la metodología, partiremos de muestras de heces de corderos sanos y enfermos, así como de muestras de sus respectivas madres. Dichas muestras serán tomadas semanalmente desde el tercer o cuarto día tras el parto hasta el día del sacrificio del cordero (aproximadamente cuatro semanas). Asimismo se realizarán controles de peso de los animales. Las muestras serán procesadas aislando los agentes etiológicos en los medios de cultivo apropiados. Realizaremos PCR y estudios metagenómicos para conocer el contenido microbiológico de las heces de los animales en estudio. Mediante la metodología aplicada, podremos comparar la microbiota intestinal presente en animales sanos y enfermos, analizando los resultados obtenidos. Además, se estudiarán con más detalle las cepas de *Escherichia coli* aisladas, con especial interés en la determinación de los factores de virulencia expresados por las mismas. Tras el análisis estadístico de los datos obtenidos se tratará de obtener las conclusiones adecuadas que nos lleven al diseño de un producto probiótico efectivo en el tratamiento de las diarreas en los corderos.



P12

**DETECCIÓN DE MAEDI VISNA EN GLÁNDULA MAMARIA
MEDIANTE TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA**

**E. Gayo¹, L. Polledo², C. Pérez Martínez¹, M. J. García Iglesias¹,
A. Balseiro³ y J. F. García Marín¹**

¹Histología y Anatomía Patológica, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. ²Micros Veterinaria, León. ³Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Área de Sanidad Animal, Centro de Biotecnología Animal, Deva, Gijón, Asturias

La enfermedad del Maedi-Visna ovino (MV) está ampliamente extendida entre el ganado ovino en España, teniendo especial importancia en Castilla y León en ovinos de producción intensiva de leche, con seroprevalencias superiores al 80%. La presencia de pequeños infiltrados celulares intersticiales ha sido considerada como normal en la mama de ovejas, algo que en nuestra experiencia no ocurre así en ovinos de producción intensiva de leche. En este trabajo se llevaron a cabo estudios histopatológicos, serológicos e inmunohistoquímicos (IHQ) frente a la glicoproteína gp135 del virus Maedi-Visna (VMV) en 17 ovinos de raza Assaf procedentes de explotaciones de leche seropositivas a MVV, siendo 12 de ellos seropositivos y 5 seronegativos (controles). De los animales seropositivos, 6 presentaban clínica asociada a Maedi-Visna, tanto de la forma mamaria con la presencia de mamitis y pérdida de producción láctea (n=6) como pulmonar (disnea) (n=3) o nerviosa (n=1). En la glándula mamaria las lesiones (infiltrados celulares intersticiales) se clasificaron en leves o mínimas (+), con pequeños agregados focales de células linfocitos y macrófagos (n=5), moderadas (++) con 2 a 15 agregados /foliculos linfoides y mamitis intersticial más extensa (n=5), y graves (+++), con más de 15 agregados/foliculos linfoides y mamitis intersticial grave con destrucción difusa de acinis (n=2). No se observó ningún infiltrado intersticial en los 5 animales controles. Mediante la técnica de IHQ frente a la gp135 en secciones histológicas se detectó VMV en todos los animales seropositivos, independientemente del grado de lesión, confirmando que las lesiones “mínimas” serían formas infecciones por VMV. Las células positivas fueron macrófagos, observados entre el infiltrado inflamatorio, interepiteliales y libres en la luz de conductos, siendo negativas las células epiteliales de estos últimos, no confirmando la hipótesis de la posible infección y replicación vírica en epitelios. Asimismo, la histopatología junto con la técnica de IHQ y el anticuerpo empleado se confirmaron como de gran utilidad en el diagnóstico y valoración del MV ovino.



P13

 AISLAMIENTO DE *Brucella suis* EN LA POBLACIÓN DE JABALÍES DE CASTILLA Y LEÓN DE 2011 A 2014

J. L. Cañas Abejón, M. A. Díez Martínez, B. Vidal Saldaña, M. R. Esquivel García, L. M. Fernández Calle, M. C. Martínez Nistal y O. Mínguez González

Laboratorio Regional de Sanidad Animal, Servicio de Sanidad Animal,
Dirección General de Producción Agropecuaria e Infraestructuras Agrarias,
Consejería de Agricultura y Ganadería de Castilla y León

La Brucelosis, por su importancia, está incluida en el Plan de Vigilancia Sanitaria permanente de Fauna Silvestre de Castilla y León, siendo el jabalí la especie más abundante y extendida por todo el territorio. En este estudio se pretende determinar tanto el número de ejemplares de jabalí en los que se aísla *Brucella suis*, como la evolución de la positividad entre los años 2011 a 2014. Las muestras incluyen ganglios linfáticos mamaros e ilíacos, mama y útero, semen, epidídimo y glándulas sexuales accesorias. Para el aislamiento se sembró en medio selectivo para *Brucella* (agar Farrell) mediante impronta directa y/o a partir de homogeneizado. En las colonias morfológicamente compatibles con *Brucella* se realizó tinción Gram, aglutinación con antiseros específicos y confirmación por PCR. Entre 2011-2013 se determinó el género mediante la PCR a tiempo real descrita por Probert et al., y la especie según la PCR convencional multiplex desarrollada por García-Yoldi et al. A partir de 2014 se utiliza el kit comercial Ingene q Bruce-ladder V SONDAS typing (INGENASA). Las colonias positivas se enviaron al Laboratorio Nacional de Referencia (Santa Fe, Granada), para la determinación del biotipo. En total se analizaron 4.623 jabalíes, aislando *B. suis* en 252 de ellos (5,45%). El porcentaje de aislamientos aumenta de forma significativa en el año 2014 (124 positivos de 1.513 muestras; 8,20%), respecto a 2011 (24 de 496; 4,84%), 2012 (52 de 1.534; 3,39%) y 2013 (52 de 1.080; 4,81%). Este incremento podría estar relacionado con una mayor prevalencia en jabalíes que deberá confirmarse en siguientes muestreos; desde el punto de vista laboratorial se ha observado que coincide con:- mayor cantidad de muestras que incluyen ganglios linfáticos frente a muestras exclusivamente de vísceras.- siembra de homogeneizado mediante extensión con asa de Henle en lugar de hisopos.

Financiación: Programa Epidemiológico Transfronterizo de Investigación de Zoonosis (project 0441_ZOONOSIS_2_E), en el marco del Programa Operativo de Cooperación Transfronteriza España-Portugal (POCTEP).



P14

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE GUMBORO COMPARANDO CIVTEST® AVI IBD CON OTROS 3 KITS COMERCIALES

**Jean-Louis Pinsard¹, Jean-Marc Le Bodo¹, Jorge Villa Viñas¹,
Sandra Gascón Torrens² y Lourdes Porquet Garanto³**

¹Bio Chêne Vert - FINALAB, Châteaubourg, France. ²HIPRA FRANCE, 44800 Saint-Herblain, France. ³HIPRA, 17170 Amer, Girona, España

El objetivo de este trabajo es comparar la serología del virus de Gumboro utilizando 4 kits comerciales (CIVTEST AVI IBD, ELISA-I, ELISA-S y ELISA-B), todos ellos ELISAs indirectos. Para ello se seleccionaron pollos de engorde de 6 granjas distintas de Francia. Todos los grupos de animales se vacunaron con vacuna viva atenuada, HIPRAGUMBORO GM97. Se analizó una muestra representativa de sueros de cada uno de los 6 lotes a día 1 de edad, a día de vacunación y en el momento del sacrificio. Todos los kits detectaron la inmunidad maternal, la pérdida de inmunidad pasiva y la seroconversión debido a la vacunación, excepto en un lote de animales en el que los anticuerpos maternos neutralizaron la vacunación. Como ejemplo de valor de títulos, a día 1 de vida los valores medios obtenidos en los distintos lotes de animales fueron con CIVTEST AVI IBD, ELISA-I, ELISA-S y ELISA-B, respectivamente, los siguientes: 5805, 4505, 4566, 4787; y los coeficientes de variación: 26, 28, 32 y 34%. En casi todas las situaciones, el ELISA-B fue el que presentó resultados más elevados en comparación con los otros kits. El día de vacunación, el ELISA-S fue el que obtuvo resultados más diferentes en cuanto a coeficiente de variación debido a la presencia de una alta cantidad de valores 0. Los 4 ELISAs, a día 1 de edad y en el momento del sacrificio, presentan similar cinética y ofrecen la misma interpretación de resultados en los 6 lotes de animales. Es en el día de vacunación donde se observan mayores diferencias.



P15

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE ESTAFILOCOCOS AISLADOS EN PEQUEÑOS RUMIANTES EN ANDALUCÍA: ESTUDIO GENÉTICO SOBRE PRESENCIA DEL GEN *mecA*

Belén Barrero-Domínguez¹, Inmaculada Luque¹, Belén Huerta¹, Ángela Galán-Relaño¹, Almudena Pérez², Carmen Tarradas¹ y Rafael J. Astorga¹

¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Córdoba. ²Laboratorio de Investigación Aplicada, Subdirección General de Asuntos Periféricos, Ministerio de Defensa, Córdoba

En este trabajo se han analizado 58 muestras de leche de tanque de explotaciones caprinas y ovinas ubicadas en Andalucía con antecedentes de mamitis clínicas/subclínicas. A partir de estas muestras se aislaron 45 cepas de estafilococos. 10 cepas fueron identificadas como ECP (22,22%), detectando *S. aureus* (17,78%) y *S. hyicus* (4,44%); el resto de cepas fueron ECN (77,78%), siendo *S. lentus* (20%), *S. simulans* (15,56%), *S. caprae* (13,33%) las especies más frecuentes. Las cepas de *S. aureus* fueron confirmadas mediante PCR (presencia del gen NUCSA).

Las pruebas de sensibilidad in vitro se realizaron siguiendo el método de Kirby-Bauer sobre agar Mueller-Hinton (Oxoid, Ltd.) y evaluando 11 antimicrobianos (Oxoid). 23 de las 45 cepas (51,11%) fueron sensibles a todos los antimicrobianos. Las resistencias más frecuentes se detectaron frente a tetraciclina (31,11%) y penicilina (22,22%). Asimismo, identificamos 2 cepas multirresistentes (9%) de las especies *S. caprae* y *S. aureus*.

Para comprobar el origen de la resistencia a los β -lactámicos se llevó a cabo el método de difusión en disco de oxacilina (1 μ g); la resistencia a este antimicrobiano indica resistencia a la meticilina y por ende a todos los β -lactámicos. 14 de las 45 cepas (31,11%) ensayadas mostraron esta resistencia. A continuación, y para confirmar si la resistencia a oxacilina estaba asociada a la presencia del gen *mecA*, se realizó el test de Kirby-Bauer con cefoxitin (30 μ g); las cepas resistentes a cefoxitin presentarían el gen *mecA*. En este caso, solo 1 cepa de *S. aureus* fue resistente. Debido a que existe la posibilidad de que cualquier cepa haya adquirido el gen *mecA* y no lo exprese fenotípicamente, todas las cepas aisladas fueron estudiadas mediante PCR específica para dicho gen. Ninguna de las cepas presentó el gen *mecA*, incluida la cepa de *S. aureus* resistente a cefoxitin. Este hecho nos induce a pensar en la existencia de otros mecanismos y genes causantes de estas resistencias bacterianas.



P16

APLICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE *Salmonella typhimurium* AISLADA DE CASOS CLÍNICOS EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES

A. L. Solarte, F. C. Aguiar, R. Astorga, A. Galán-Relaño, A. Maldonado y B. Huerta

Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

Los animales de abasto son reservorio de bacterias resistentes para el hombre debido al contacto directo y al consumo de alimentos. La creciente inquietud por la seguridad alimentaria “desde la granja a la mesa” ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de los microorganismos implicados en toxi-infecciones alimentarias, como salmonela. Hemos desarrollado un ensayo in vitro para valorar la actividad antimicrobiana de 10 aceites esenciales frente a 23 cepas de *S. Typhimurium*, aisladas de casos clínicos en distintas especies animales. Realizamos un estudio inicial de cribado, mediante el Test de difusión por discos frente a diez de las cepas, donde se determinó la ausencia de actividad del aceite de naranja y a su vez se seleccionaron los aceites de tomillo rojo, orégano, tomillo vulgar, clavo y canela para su estudio cuantitativo (halo de inhibición 15,07-20,87mm). Posteriormente, mediante Microdilución en caldo se valoró la actividad inhibidora (CMI) y bactericida (CMB) frente a las 23 cepas del estudio, obteniendo los mejores resultados con el orégano, tomillo rojo y tomillo vulgar (CMIs 0,048-0,126% y CMBs 0,060-0,156%). Para determinar la potencia microcida se estimó el índice CMB/CMI, encontrando en todos los casos valores próximos a la unidad, lo que demuestra la capacidad de estos aceites para inhibir y destruir la bacteria con una misma concentración. Teniendo en cuenta las diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas a un mismo aceite, se calculó la CMI₅₀, CMI₉₀, CMB₅₀ y CMB₉₀, y sus respectivos índices. Destacamos la capacidad del orégano para inhibir y destruir el 50 y el 90% de las cepas estudiadas a una concentración del 0,03 y 0,06%, respectivamente, con un índice igual a la unidad (CMB₅₀/CMI₅₀ y CMB₉₀/CMI₉₀ =1). Finalmente, no se hallaron diferencias significativas entre las cepas sensibles y resistentes a los antimicrobianos.



P17

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DIVERSOS ACEITES ESENCIALES FRENTE A *Streptococcus suis*

F. Aguiar, A. L. Solarte, L. Gómez-Gascón, Belén Barrero-Domínguez, I. Luque, C. Tarradas y B. Huerta

Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

La infección por *Streptococcus suis* constituye una de las principales patologías del cerdo y una zoonosis profesional menor. Sin una vacuna que prevenga la infección, el control se basa fundamentalmente en el uso de antibióticos, si bien el aumento de las resistencias ha incrementado el fracaso terapéutico en los últimos años y ha llevado a la búsqueda de nuevos antimicrobianos. Se ha realizado un ensayo in vitro para valorar la actividad antimicrobiana de ocho aceites esenciales frente a 10 cepas de *S. suis*. Mediante el test de difusión por discos se realizó un estudio preliminar y se seleccionaron los aceites con mayor potencial inhibidor: canela, orégano, ajo, tomillo vulgar y tomillo rojo (19-38,43 mm). Mediante la técnica de Microdilución en caldo se determinó la actividad inhibidora (CMI) y bactericida (CMB) de estos aceites. Los mejores resultados se obtuvieron para el orégano, tomillo rojo, tomillo vulgar y la canela con CMIs 0,076-0,136%, CMBs 0,095-0,150% y una potencia microcida muy próxima a la unidad (índice CMB/CMI = 1), lo que demuestra el carácter bactericida de estos aceites. Sin embargo, se ha observado diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas a un mismo aceite, por lo que se calculó la CMI₅₀, CMI₉₀, CMB₅₀ y CMB₉₀, y sus respectivos índices. El tomillo rojo presentó la CMI₅₀ más baja (0,06%), si bien duplicó esta concentración para la CMI₉₀. El orégano y el tomillo vulgar lograron inhibir y destruir el 50 y el 90% de las cepas estudiadas a una concentración del 0,125%, presentando, por tanto, un fuerte carácter bactericida (CMB₉₀/CMI₉₀ = 1). En base a ello, consideramos que estos aceites podrían ser una buena alternativa para el control de las infecciones por *S. suis*.



P18

VALORACIÓN DEL DIAGNÓSTICO POR RT-PCR DE LA BESNOITIOSIS BOVINA

**A. Esteban Gil, P. Peris Peris, J. M. Marcén Seral, A. Cortés Cebrián
y Juan A. Castillo**

Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria,
Universidad de Zaragoza

La besnoitiosis bovina es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Besnoitia besnoiti*, tradicionalmente endémica en países del África subsahariana y Asia que en los últimos años está experimentando una importante expansión en el continente europeo. Este reciente aumento del número de casos detectado en Europa podría estar directamente relacionado con el comercio de animales entre explotaciones, incluso países con fines de mejora genética. Los animales afectados de manera subclínica, que en el caso de la besnoitiosis bovina son la mayoría, podrían estar jugando un importante papel a este respecto. Por tanto, la determinación del estado frente a la infección por *B. besnoiti* previa a la entrada o salida de nuevos animales resulta crucial como una de las principales medidas de control de la enfermedad. Generalmente, en las explotaciones dirigidas a la producción de carne los machos suelen ser a menudo los animales de mayor valor del rebaño. En este trabajo se propone el estudio del estado frente a la infección de todos los toros adultos presentes en una explotación extensiva del pirineo aragonés mediante la realización de un análisis serológico con la técnica de Inmunofluorescencia (IFI), un examen clínico en busca de los signos típicos de la enfermedad (quistes en la conjuntiva ocular y alteraciones cutáneas) y una detección de ADN del parásito en biopsias de piel e hisopo de conjuntiva ocular mediante la técnica de qPCR. De los 14 individuos analizados, 6 de ellos resultaron seronegativos, 5 seropositivos subclínicos y 3 seropositivos con signos clínicos de enfermedad. De los animales seronegativos, ninguno presentó rastros de ADN del parásito. Dentro de los animales seropositivos, un 40% (2/5) de los animales infectados subclínicos presentaron ADN del parásito tanto en biopsia de piel como en conjuntiva ocular frente al 100% (3/3) y 66,6% (2/3) en biopsia de piel e hisopo respectivamente de los seropositivos con signos clínicos de enfermedad. A la vista de estos resultados preliminares, la técnica de qPCR en hisopo de conjuntiva ocular se presenta como una prueba no invasiva y muy sensible que podría ser de elección para la identificación de animales potencialmente portadores del parásito.



P19

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS KITS ID SCREEN® INTERFERON GAMMA CAPTURE Y BOVIGAM® EN MUESTRAS RECOLECTADAS Y ACTIVADAS DURANTE LOS AÑOS 2014 Y 2015

**Anna Greatrex¹, Philippe Pourquier¹, Loïc Comtet¹, Laura Olagnon¹,
Tania Rubio Fernández², Francisca Copano Romero², Pablo Arenas
Valls² y Juan Francisco Pantiga Fernández²**

¹IDvet, Grabels, France. ²Laboratorio de Sanidad Animal del Principado
de Asturias, Jove, Gijón, Asturias, España

Hasta el año 2014, el único reactivo autorizado en España para ser utilizado en el diagnóstico de la Tuberculosis Bovina ha sido Bovigam®. En Europa, los criterios de interpretación del kit Bovigam® difieren de acuerdo al país en el que se utiliza; por ejemplo: en Alemania, $PPDb-PBS \geq 0.1$ y $PPDb > PPDa$, en Grecia $PPDb - PBS \geq + 0.1$ y $PPDb-PPDa \geq 0.1$ y en Inglaterra, $PPDb - PPDa > 0.1$. En España, el kit de Bovigam® se utiliza aplicando otros criterios de interpretación: ($PPDb-PBS \geq 0.05$ y $PPDb > PPDa$). El cut-off español de Bovigam® es bajo comparado al cut-off aplicado en otros países. En 2015, el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente autorizó la comercialización del kit ELISA ID Screen® Interferon Gamma Capture de IDvet, Francia. Este kit expresa el nivel de IFN-g con respecto a un control positivo liofilizado ($S/P\% = PPDb-PPDa)/(CP-CN) \times 100\%$) para permitir la estandarización de los resultados. Por otra parte, la fórmula tiene en cuenta la amplitud de la diferencia entre PPDb y PPDa, contrariamente al kit Bovigam®. Durante 2014 y 2015, se recibieron en el Laboratorio de Sanidad Animal de Asturias muestras procedentes de rebaños en los que por lo menos se obtuvo un resultado positivo a la intradermotuberculinización; dichas muestras fueron activadas de acuerdo al protocolo de activación del Ministerio. Los plasmas, tras su activación, fueron analizados utilizando el kit ELISA Bovigam® y posteriormente almacenados a -20°C . En octubre 2015, se seleccionaron 274 muestras de dichos plasmas y se analizaron con el kit ELISA ID Screen®. Además, se analizaron muestras almacenadas en el laboratorio y verificadas como Material de Referencia. Por otro lado, se ensayaron 6 muestras procedentes de un ensayo de inter-comparación organizado por el Ministerio en 2008. El plasma bovino activado liofilizado, producido por IDvet, también fue analizado para evaluar la repetibilidad y la sensibilidad analítica. Los resultados comparativos obtenidos serán presentados.



P20

NUEVO MÉTODO INMUNOTURBIDIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA C-REACTIVA EN SUERO DE PERRO

**Matilde Piñeiro¹, Raquel Pato², Lourdes Soler³, Natalia García³,
María A. Álava³, Fermín Lampreave³, Yolanda Saco²,
Francesca Canalias⁴ y Anna Bassols²**

¹Acuvet Biotech, Zaragoza. ²Servei de Bioquímica Clínica Veterinaria, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinaria y ⁴Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, ³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza

Las proteínas de fase aguda (PFA) son proteínas del suero sanguíneo que aumentan de concentración en respuesta a la presencia de procesos inflamatorios causados por heridas, lesiones, infecciones o situaciones de estrés. Su interés clínico en el ámbito veterinario ha aumentado en los últimos años, dado su valor como marcadores de salud y bienestar animal. En el perro, al igual que en la especie humana, la proteína C-reactiva (CRP) es la principal PFA, presente en el suero en muy baja concentración y con una rápida elevación tras el estímulo inflamatorio. La CRP se utiliza en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades inflamatorias o infecciosas. Su concentración en suero correlaciona con la severidad del proceso inflamatorio y refleja la evolución de la enfermedad, lo que la convierte en un excelente marcador para evaluar la eficacia de los tratamientos, o detectar complicaciones en el seguimiento post-operatorio. En este trabajo se presenta la validación de un nuevo método para la determinación de la CRP en el suero de perro (TURBOVET CRP canina, Acuvet Biotech), fácilmente adaptable a diferentes analizadores de bioquímica clínica. Se trata de un método inmunturbidimétrico amplificado con partículas de látex, que utiliza anticuerpos y patrones específicos para la CRP canina. Presenta una excelente precisión (CV intraserial < 2 %, CV interdiaria < 3 %, analizador Olympus AU400), con un rango lineal de hasta 150 mg/L y un rango de seguridad (sin efecto hook) de al menos 300 mg/L. No se observan interferencias por hemoglobina (20 g/L), triglicéridos (10 g/L Intralipid®) o bilirrubina (0,15 g/L). TURBOVET CRP canina es un método rápido, robusto y automatizable, que facilita la incorporación de este parámetro analítico en la clínica veterinaria.



P21

NUEVOS MÉTODOS INMUNOTURBIDIMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA PIG-MAP Y PROTEÍNA C-REACTIVA EN SUERO DE CERDO

**Matilde Piñeiro¹, Raquel Pato², Natalia García³, Lourdes Soler³,
Yolanda Saco², Francesca Canalias⁴, Anna Bassols², María A. Álava³
y Fermín Lampreave³**

¹Acuvet Biotech, Zaragoza. ²Servei de Bioquímica Clínica Veterinaria, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinaria y ⁴Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona. ³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza

La concentración en suero de las proteínas de fase aguda (PFA) se modifica en presencia de procesos inflamatorios causados por heridas, lesiones, infecciones o situaciones de estrés, por lo que se utilizan como biomarcadores de salud y bienestar animal. En producción porcina, la determinación de PFA como la Pig-MAP o la proteína C-reactiva (CRP) permite detectar situaciones de estrés o enfermedades subclínicas que comprometen el bienestar animal y afectan a los rendimientos productivos. Las PFA se analizan habitualmente mediante ELISA, técnica laboriosa y que presenta una relativamente alta variabilidad. En este trabajo se presenta la validación de dos nuevos métodos inmunturbidimétricos automatizados para la cuantificación de Pig-MAP y CRP en suero de cerdo, fácilmente adaptables a diferentes analizadores de bioquímica clínica. Los métodos desarrollados (TURBOVET Pig-MAP y CRP porcina, Acuvet Biotech) presentan una excelente precisión (CV intraserial 0,98). No se detectan interferencias por hemoglobina (20 g/L), triglicéridos (4 y 10 g/L Intralipid® para Pig-MAP y CRP, respectivamente) o bilirrubina (0,15 g/L). TURBOVET Pig-MAP y CRP porcina son métodos rápidos (resultados en 5 minutos), robustos y automatizables, que representan una excelente alternativa al método ELISA.



P22

DIAGNÓSTICO DE *Brachyspira hyodysenteriae* Y *Brachyspira pilosicoli* EN GRANJAS PORCINAS ESPAÑOLAS Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE 137 AISLADOS DE *B. hyodysenteriae* DURANTE EL PERÍODO 2011-2014

**Rubén Miranda-Hevia, Lorena Álvarez-González,
Ana Carvajal-Urueña y Pedro Rubio-Nistal**

Enfermedades Infecciosas, Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León

La disentería porcina es una enfermedad infecciosa que afecta al intestino grueso de cerdos adultos de cebo y engorde. Está causada por *Brachyspira hyodysenteriae*, una espiroqueta intestinal anaerobia que afecta el revestimiento del intestino, dando lugar a diarreas mucohemorrágicas. Por otra parte, la diarrea por espiroquetas (espiroquetosis intestinal porcina), cuyo agente etiológico es *Brachyspira pilosicoli*, cursa con diarrea acuosa a mucoide en cerdos jóvenes y adultos. En nuestro laboratorio se realiza la detección de ambas bacterias mediante la combinación de técnicas de cultivo microbiológico y de biología molecular específicas (PCR).

La prevalencia de disentería ha permanecido estable en los últimos años. Desde el 2011 hasta el 2014, un total de 203, 164, 116 y 117 granjas han sido analizadas respectivamente, siendo el porcentaje de granjas positivas a *B. hyodysenteriae* de un 46,8% en 2011, un 34,8% en 2012, de un 44,83% en 2013 y de un 44,44% en 2014.

En contraste, durante estos años la presencia de *B. pilosicoli* ha sido prácticamente nula, habiendo aparecido únicamente 7 casos sobre el total de muestras analizadas en 2011 (0,38%), 8 muestras en 2012 (0,57%), ningún caso en 2013 y 4 muestras en 2014 (0,47%).

Debido al alto uso de antibióticos en el control de la disentería, el nivel de resistencia de *B. hyodysenteriae* ha aumentado en estos años. Por ese motivo, la detección de la susceptibilidad antimicrobiana es una herramienta de gran utili-



dad en el diagnóstico de esta enfermedad. En nuestro caso, se trabaja mediante microdilución en placas comerciales que incluyen seis antibióticos: tiamulina, valnemulina, doxiciclina, tilvalosina, tilosina y lincomicina. En este trabajo se han calculado en $\mu\text{g/ml}$ las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para el 50% y el 90% de los aislados. Los resultados han sido: tiamulina CMI₅₀ = 2, CMI₉₀ > 8; valnemulina CMI₅₀ = 1, CMI₉₀ > 4; doxiciclina CMI₅₀ = 1, CMI₉₀ > 4; tilvalosina CMI₅₀ = 4, CMI₉₀ = 16; lincomicina CMI₅₀ = 32, CMI₉₀ > 64 y finalmente los valores de tilosina fueron > 128 tanto para CMI₅₀ como para CMI₉₀.



P23

DETECCIÓN DE LA NUEVA VARIANTE DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO

Kevin P. Dalton, Rosa Casais, Inés Nicieza, Ana Podadera, Daniel del Llano, José Manuel Martín Alonso, J.R. de los Toyos, M. García Ocaña, F. Vázquez, J.L. Arnal, A.A. Benito, G. Chacón, O. Landeta y Francisco Parra
Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA),
Área de Sanidad Animal, Centro de Biotecnología Animal, Deva, Gijón, Asturias

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV, del inglés Rabbit Haemorrhagic Disease virus) se describió por primera vez en los años 80 y causó grandes pérdidas en granjas comerciales españolas. Las vacunas inactivadas basadas en homogenizados de hígados infectados fueron utilizadas como un control efectivo de la enfermedad. Sin embargo, el panorama cambió en 2011 con la aparición de una nueva variante del RHDV (denominada RHDVb), contra la que las vacunas convencionales fueron ineficaces. La aparición de RHDVb condujo a la necesidad de nuevos diagnósticos y vacunas específicas. El desarrollo de vacunas basadas en homogeneizados de hígado de animales infectados con RHDVb en los que el virus se inactiva químicamente ha sido importante para intentar controlar este virus. Sin embargo, la selección de la vacuna adecuada (convencional o específica del RHDVb) requiere un diagnóstico rápido, sensible y específico. Esto es aún más importante teniendo en cuenta que la vacunación contra RHDV se utiliza a menudo en las granjas como medida de protección frente a brotes en curso.

Se han empleado pruebas de RT-PCR y secuenciación para analizar las cepas de RHDVb circulantes en las granjas españolas para el análisis filogenético de estos virus y para el diseño de nuevos diagnósticos específicos basados en RT-PCR. A partir de estos datos se han diseñado RT-PCRs convencionales y puesto a punto una qRT-PCR específica, en colaboración con EXOPOL, para la detección de RHDVb.

Utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente al RHDVb, en colaboración con la empresa Certest, se ha desarrollado y validado una prueba inmunocromatográfica rápida y específica para RHDVb. Este sistema permite la identificación y tipificación de RHDV o RHDVb en 10 minutos tanto en la granja o en el laboratorio. La prueba hace posible que el ganadero o el veterinario puedan tomar una decisión rápida para la correcta selección de las vacunas que deban administrarse.

**P24**

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE CRUDA

Luis Mata, David Sanz y Pedro Razquin

ZEULAB, S.L., Zaragoza

Un nuevo sistema para el cribado de residuos de antibióticos en leche cruda ha sido validado de acuerdo a la Decisión Comunitaria 2002/657/EC y a la guía ISO 13969. El nuevo método combina un test de inhibición microbiana (Eclipse Farm) y un equipo (e-Reader) que integra la incubación a 65°C y la monitorización del cambio de color del test a lo largo del ensayo. Eclipse Farm es un test en tubo basado en la inhibición del crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus*. Cuando los tubos se incuban a 65°C las células crecen y liberan un ácido que provoca el cambio de color del medio. Si la muestra contiene antimicrobianos, el microorganismo no puede crecer y por lo tanto no habrá cambio de color o será muy limitado. Gracias a la monitorización del cambio de color del test a lo largo del ensayo, el equipo determina de forma automática el momento de su finalización e interpreta de forma objetiva el resultado.

En este estudio se han determinado los límites de detección (LD) para 30 moléculas de las principales familias de antimicrobianos. Los LD fueron muy ajustados a los correspondientes límites máximos de residuos (LMR). Posteriormente, se determinó la Capacidad de Detección (CCbeta) sobre 6 moléculas que representan las principales familias de antimicrobianos usadas en producción lechera. Todas las moléculas evaluadas (amoxicilina, cefalexina, oxitetraciclina, sulfatiazol, gentamicina y tilosina) fueron detectadas al nivel o por debajo de los LMR correspondientes.

La robustez del sistema fue también evaluada demostrando que el nuevo método no era afectado por cambios razonables en el procedimiento: volumen de muestra ($\pm 20\%$), temperatura de incubación ($\pm 2^\circ\text{C}$), lote del test, etc. La aplicabilidad del método se demostró para leche de vaca cruda tanto de tanque como de animales individuales con independencia del contenido en grasa, proteína o células somáticas. Las muestras analizadas en el estudio tenían un contenido



de 1.3 a 7.1% de grasa, 2.2 a 5.0% de proteína y hasta 2.3×10^7 células somáticas.

Eclipse Farm junto a e-Reader han demostrado ser una valiosa herramienta para el cribado de antimicrobianos en leche cruda de vaca. El nuevo método simplifica el análisis e incrementa la fiabilidad de los resultados, ya que es capaz de determinar de forma automática el momento final del ensayo interpretando los resultados de forma objetiva.



P25

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IgGs EN MUESTRAS DE LECHE DE OVEJA DE CISTERNA MEDIANTE TEST ELISA

**Patricia Galán-Malo, José Antonio Valares, Vanesa Langa,
Pedro Razquin y *Luis Mata***
ZEULAB, S.L., Zaragoza

La adición de calostro a la leche afecta negativamente al rendimiento de la fabricación del queso. Debido a los elevados niveles de IgGs presentes en el calostro, la determinación de los niveles de esta proteína en leche es aceptada como una evidencia de la presencia de este problema. El estudio aquí presentado muestra por primera vez los niveles de IgGs en muestras de leche de oveja procedentes de cisternas recogidas en España durante un año. La cuantificación de IgGs se ha realizado mediante el análisis con un test ELISA sándwich que reconoce específicamente las IgGs de oveja. El valor medio obtenido a partir del análisis de 481 muestras fue de 0.271 ± 0.253 mg/ml. En general, estos valores están dentro del rango considerado como aceptable para la leche madura según los sistemas de pago por calidad. Sorprendentemente, el valor medio encontrado en las muestras recolectadas en invierno fue muy superior, 0.742 ± 0.378 mg/ml, sugiriendo que los partos se agrupan en este período. Estos resultados demuestran que la estandarización de las producciones de leche de oveja no se ha alcanzado todavía. El 72% de las muestras analizadas en este estudio se encontraron en el rango de 0.10-0.30 mg/ml de IgGs, valores muy similares se han encontrado en España para otras especies como la bovina. El 68% de las muestras presentaron niveles superiores a 0.47 mg/ml, pudiendo ser consideradas como sospechosas de haber sido mezcladas con calostros. Por esta razón la determinación periódica de los niveles de inmunoglobulinas en leche podría ser un buen parámetro de control de calidad de la leche de oveja. En vista a estos resultados, un sistema de pago por calidad basado en los niveles de IgGs podría establecerse dentro de un plan de gestión de calidad. Un primer nivel de referencia puede establecerse en valores inferiores a 0.47 mg/ml. Un segundo nivel (categoría A) se puede localizar en el rango de 0.47-0.60 mg/ml. Un tercer nivel (categoría B) puede situarse en las muestras con niveles de IgGs entre 0.60-0.80 m/ml. Finalmente, la cuarta categoría (categoría C) serían muestras con valores superiores a 0.8 mg/ml. En este estudio el 88.1% de las muestras se encontrarían entre los valores de referencia de la leche de oveja, y 3.5, 1.9 y 6.4% de ellas representarían la categoría A, B y C, respectivamente.

Patrocinadores:

Test With Confidence™

IDEXX



La Referencia
en **Prevención**
para **Salud Animal**



ThermoFisher
SCIENTIFIC



Colaboradores:

