



CUARTO EJERCICIO TURNO LIBRE ESPECIALIDAD SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL PRIMER SUPUESTO

En una explotación familiar de la provincia de Gerona, como parte del Programa de Control de Salmonella en la producción primaria, un veterinario oficial toma varias muestras ambientales (tomadas con toallitas) de distintas superficies y suelo de la explotación. Las muestras son tomadas por zonas delimitadas. Estas muestras irán destinadas al Laboratorio donde trabajas para su análisis.

Por otro lado, el dueño de la explotación ha detectado en días previos a la visita del veterinario oficial que hay dos cerdas de la explotación, Paca y Tomasa, que presentan lesiones hemorrágicas multifocales y cianosis en la piel, especialmente en las zonas extremas (orejas, miembros, cola y hocico).

Aprovechando la presencia del veterinario oficial, el dueño de la explotación le pregunta por su opinión profesional. El veterinario oficial decide tomar muestras de los dos animales ya que le ha hecho sospechar de sintomatología compatible con Peste porcina africana. Dada la importancia del proceso etiológico, se decide tomar muestras de otros 3 cerdos más.

1. Defina brevemente el agente etiológico de la Salmonelosis y su sintomatología. (3 puntos).
2. Describa lo métodos para el aislamiento y la identificación de *Salmonella spp.* Incluyendo reactivos, medios de cultivo y equipos de laboratorio empleados para el análisis de las muestras ambientales (toallitas). (5 puntos).
3. ¿Existe algún riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad que deba ser tenido en cuenta en la manipulación de las muestras y diagnóstico en el laboratorio de la Salmonelosis? Razone la respuesta. (3 puntos).
4. ¿Qué enfermedades considera que deban incluirse en un diagnóstico diferencial para la Salmonelosis y la Peste porcina africana? (1 punto).
5. Siguiendo con el diagnóstico molecular de las muestras de las dos cerdas, se pretende emplear un análisis mediante PCR a tiempo real.
 - 5.1 Describa brevemente el fundamento de la técnica (2 puntos).
 - 5.2 Describa brevemente los puntos críticos de la técnica (1.5 puntos).
 - 5.3 Describa brevemente los controles internos que usaría para asegurar el funcionamiento de la reacción. (1.5 puntos).



6. Para el diagnóstico de las muestras de porcino, se emplea el método de PCR a tiempo real para la detección del virus de la peste porcina africana. Para el diseño de esta PCR se ha consultado bibliografía y para analizar muestras de animales posibles portadores es preferible usar la que se encuentra en “Fernandez-Piñero J et al. 2013 (sonda UPL)”.

6.1 Interprete los resultados mostrados en el ANEXO1. (2.5 puntos).

6.2 Identifique y describa los puntos y fases de una curva de PCR que es necesario conocer para realizar la correcta interpretación de resultados.

(1.5 puntos).

7. Se pretende modificar un ensayo de PCR a tiempo real previamente validado en el Laboratorio con el objeto de poder utilizar primers y sondas diferentes, ya que en el último año se han encontrado problemas de suministros de una de las sondas, en concreto de Sonda UPL#162-Pr.

Estudiando la bibliografía se ha encontrado una posible opción para la modificación de estos reactivos.

7.1 ¿Qué pasos serían necesarios para validar la modificación del ensayo?

(3 puntos).

7.2 ¿Cuáles son los parámetros que se deben estudiar y que definen las características de un método de validación para la técnica de PCR tiempo real?

(2 puntos).

8. Como parte del control externo para las diferentes técnicas, el Laboratorio participa en la realización de ensayos de intercomparación analizando muestras por PCR a tiempo real del Virus de la Peste porcina africana,

8.1 ¿Cuál es la frecuencia recomendada para participar en ensayos acreditados como parte del control externo? Razone su respuesta. (1.5 puntos).

8.2 Si por alguna circunstancia, desde el Laboratorio Europeo de Referencia le transmiten que no se va a poder realizar la organización de ensayos de intercomparación para cuando se tenía previsto, ¿Qué otros ensayos de intercomparación o actividades podría implementar para seguir realizando un control externo para el diagnóstico del Virus de Peste porcina africana por PCR a tiempo real? (2.5 puntos).



ANEXO 1

Resultados gráficos de PCR a tiempo real para el diagnóstico de 5 muestras VPPA.

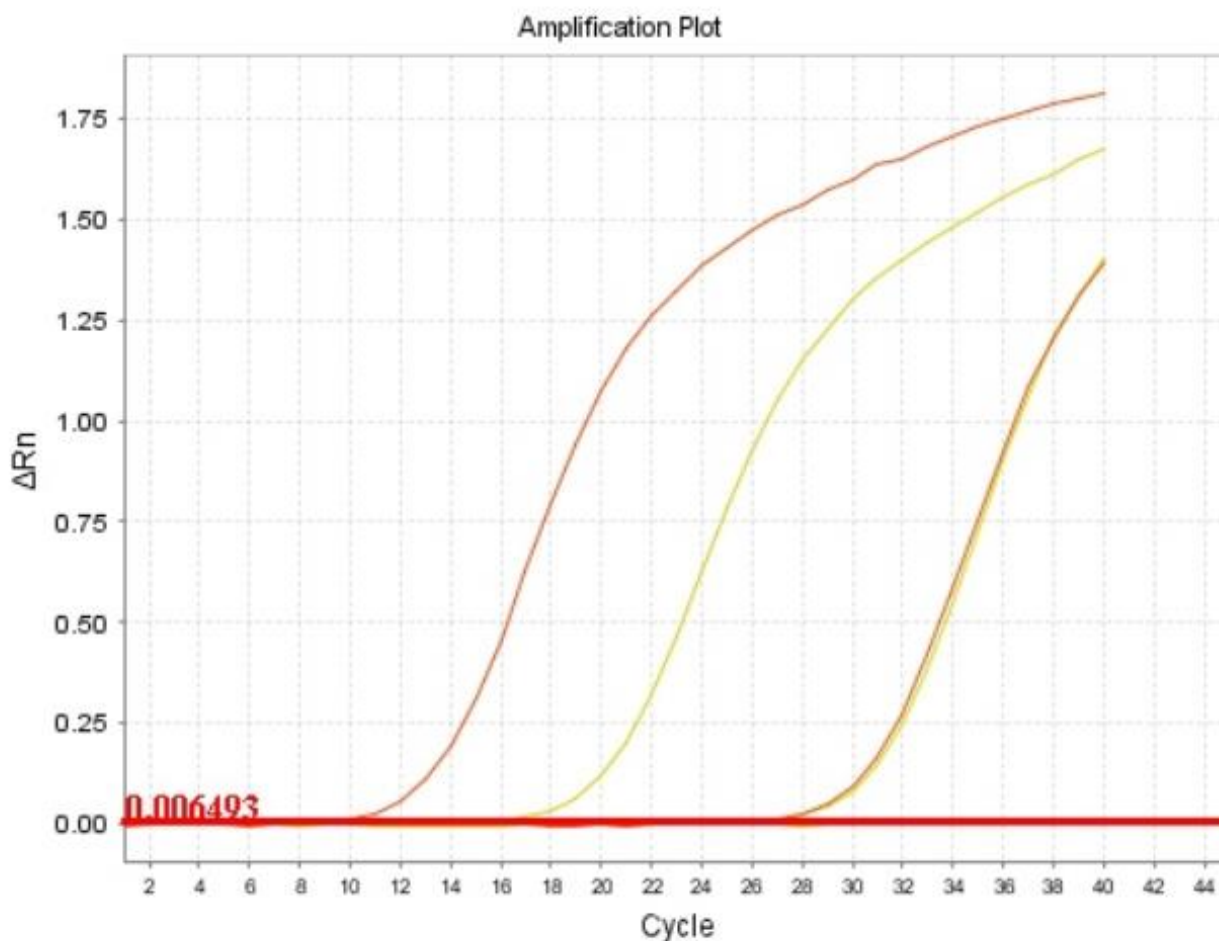


Tabla de resultados de PCR a tiempo real para el diagnóstico de 5 muestras VPPA. El ciclo umbral de corte es 27.

La ubicación de las muestras analizadas en la posición de una placa de 96 pocillos es la siguiente:

MUESTRA 1 → pocillo A9

MUESTRA 2 → pocillo A10

MUESTRA 3 → pocillo B7

MUESTRA 4 → pocillo B9

MUESTRA 5 → pocillo B10



Plate Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A									PPA UPL FAM-None Ct: 9.51	PPA UPL FAM-None Ct: 25.87		
B							PPA UPL FAM-None Ct: 16.05		PPA UPL FAM-None Ct: Undetermin...	PPA UPL FAM-None Ct: 26.45		
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tabla de resultados

	7	8	9	10
A			1 PPA UPL FAM-None Ct: 9.51	1 PPA UPL FAM-None Ct: 25.87
B	1 PPA UPL FAM-None Ct: 16.05		2 PPA UPL FAM-None Ct: Undetermin...	1 PPA UPL FAM-None Ct: 26.45

Tabla ampliada de resultados