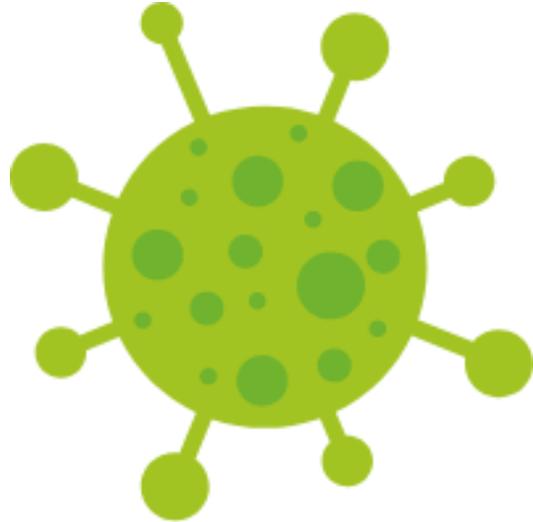
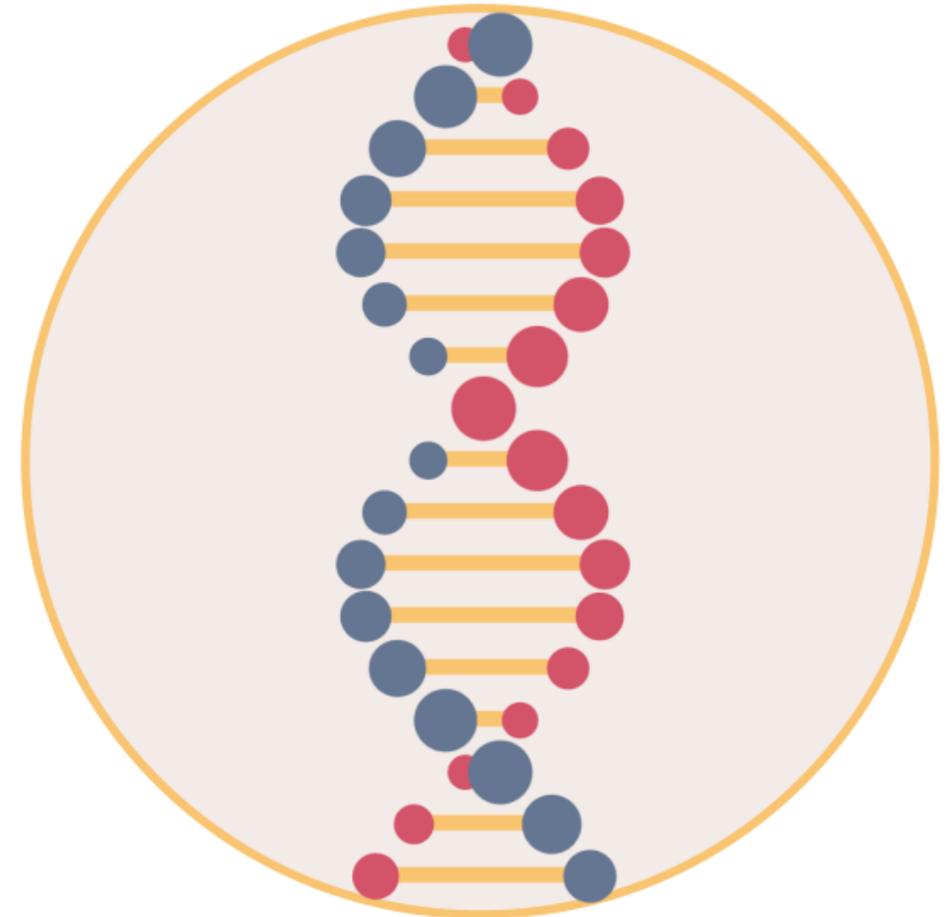


Unidad 3: VIROLOGÍA



Tema 14: Técnicas de diagnóstico virológico



Virus → parásitos intracelulares obligados

→ Cultivos de células o inoculación de animales de laboratorio

→ Técnicas costosas y tediosas

Estudio de virus

1. Aislamiento viral

2. Detección directa de antígenos virales o su genoma

3. Detección de anticuerpos

4. Observación directa de partículas en microscopio electrónico



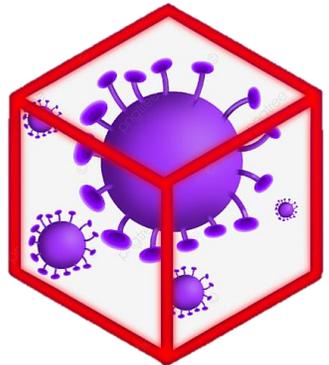
1. Aislamiento viral

Ventajas

- *Confirmación de un diagnóstico tentativo (basado en otra técnica)*
- *Enfermedad no descrita en una zona determinada*
- *Sintomatología coincidente con varios agentes virales semejantes*
- *Diagnóstico serológico no guarda relación con el agente sospechoso*

Desventajas

- *Cultivos celulares o animales de laboratorio*
- *Depende de la viabilidad del virus en la muestra problema*
- *Costoso, engorroso (pocos adeptos)*



1. Aislamiento viral

Crucial la elección y toma de muestra

Toma temprana - Fase aguda de la enfermedad

Medios especiales

Estériles

Refrigerados

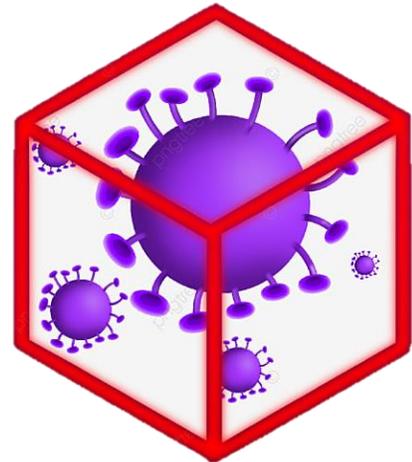
Tipos de muestra

Excreciones y exudados (saliva, heces, orina, aspirado nasofaríngeo, líquido cefalorraquídeo, etc.)

Tejidos de necropsia o biopsia

Hisopados (rectal, faríngeo, ocular, vesicular, genital)

Sangre



1. Aislamiento viral

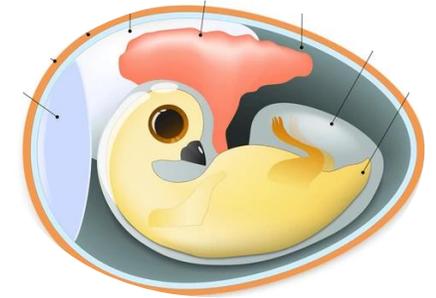
Animales de laboratorio

Ratones, hámster, conejo, cobayo
Sustituidos por cultivos de células



Huevos embrionados

Huevos fértiles de gallina → aislamiento de virus influenza e importantes como suministro de tejidos para cultivos celulares



Cultivo de células

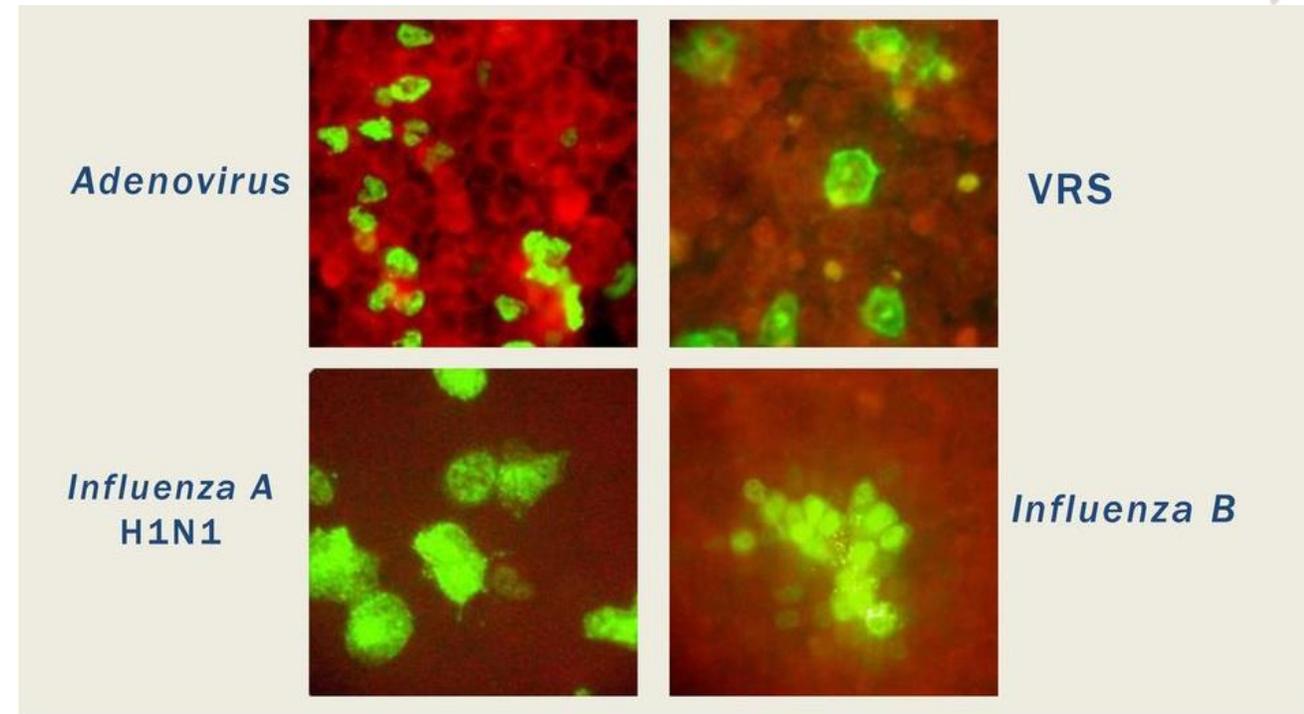
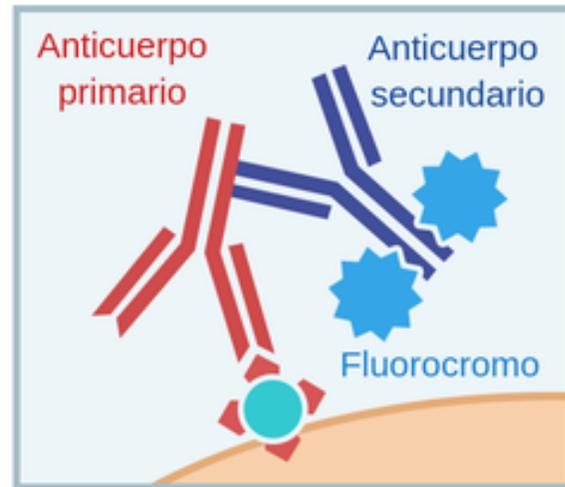
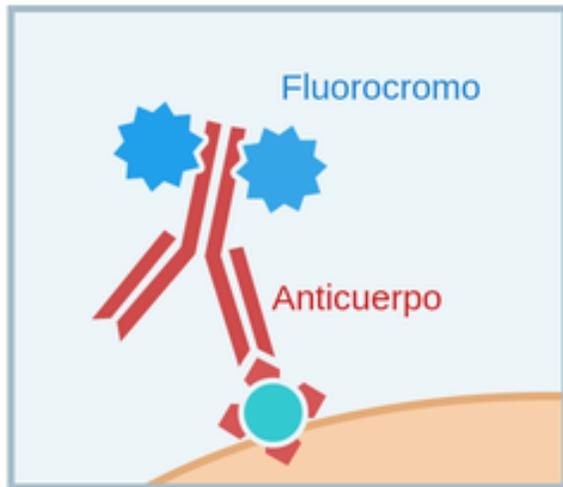
Método de elección para la replicación viral
Medios nutritivos y estériles
Diferentes tipos celulares



2. Detección directa

Antígenos virales

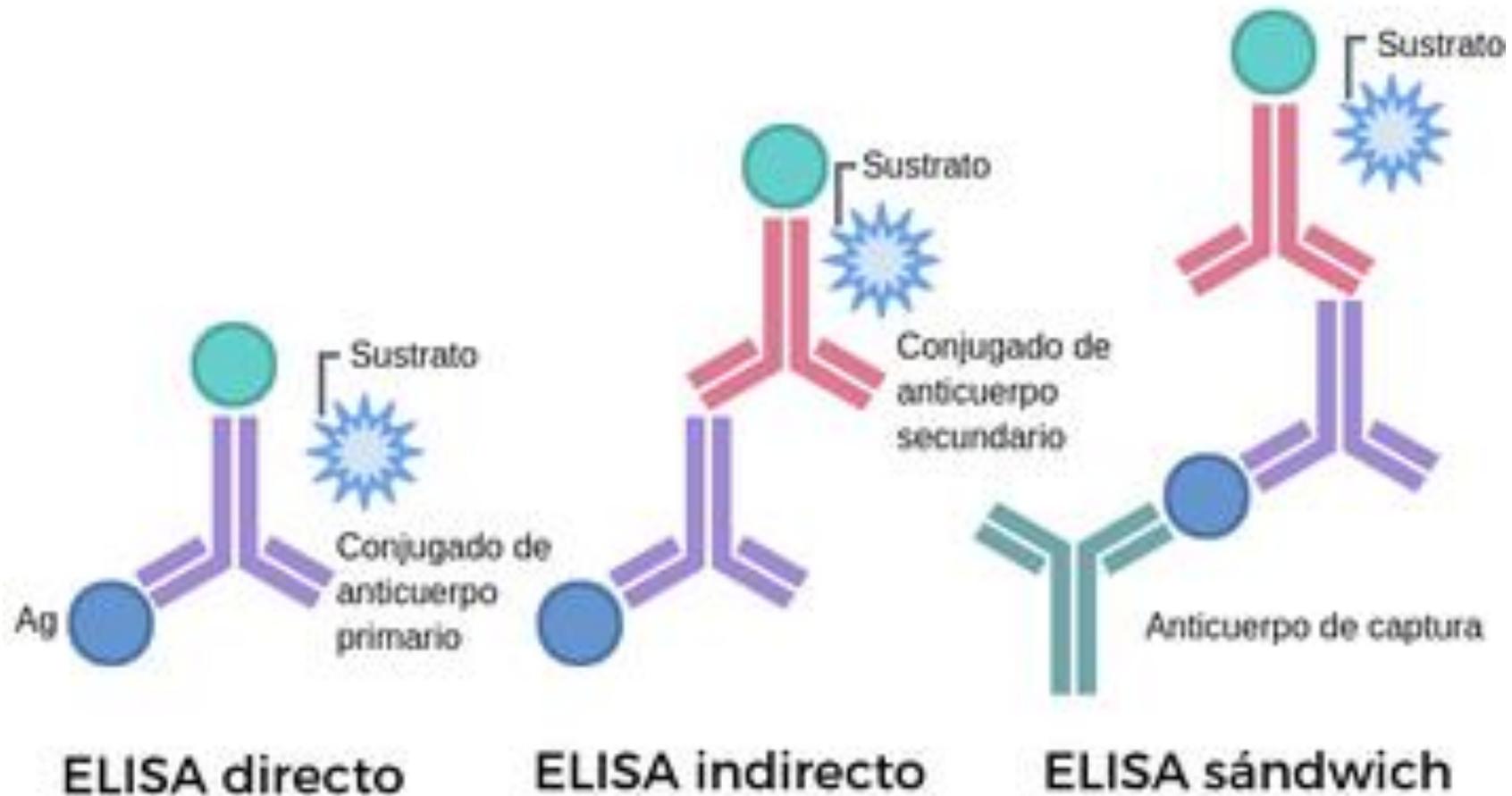
Inmunofluorescencia



2. Detección directa

Antígenos virales

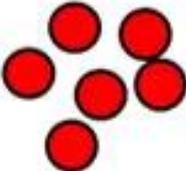
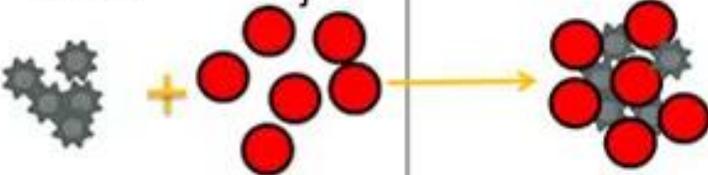
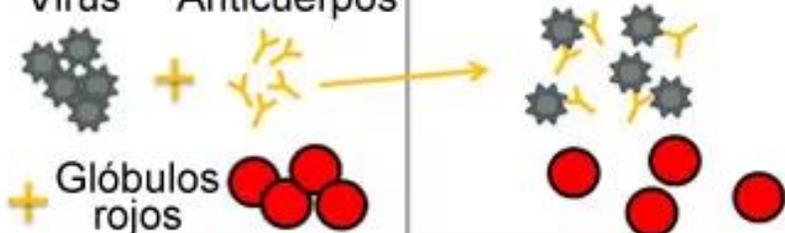
ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)



2. Detección directa

Antígenos virales

Hemaglutinación - Inhibición de la hemaglutinación

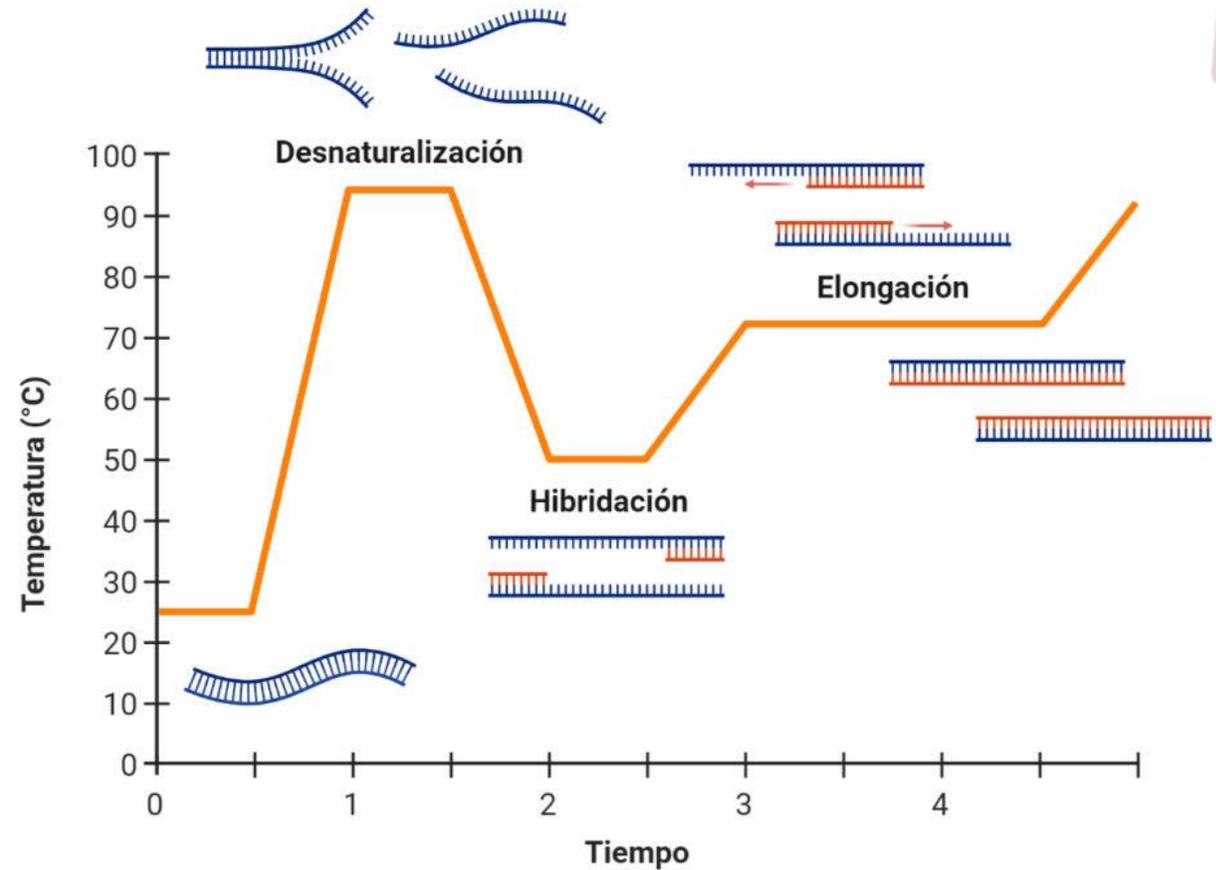
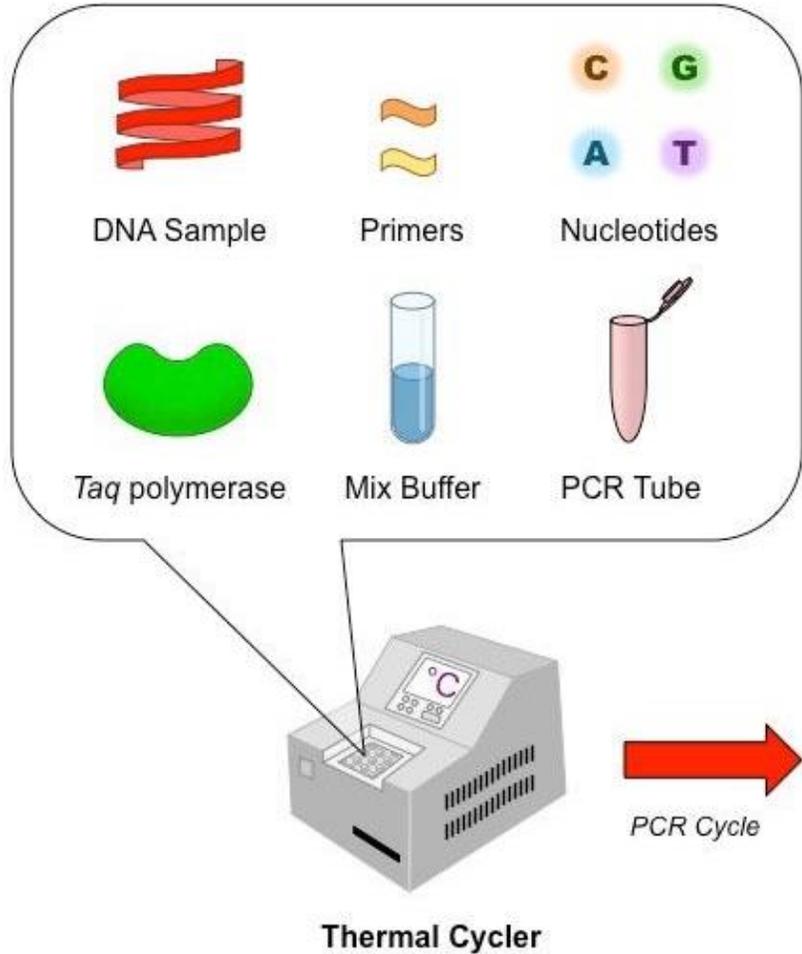
	Componentes	Interacción	Resultados de la microtituladora
A	Glóbulos rojos		Sin reacción 
B	Virus + Glóbulos rojos		Hemaglutinación 
C	Virus + Anticuerpos + Glóbulos rojos		Inhibición de la hemaglutinación 



2. Detección directa

Genoma viral

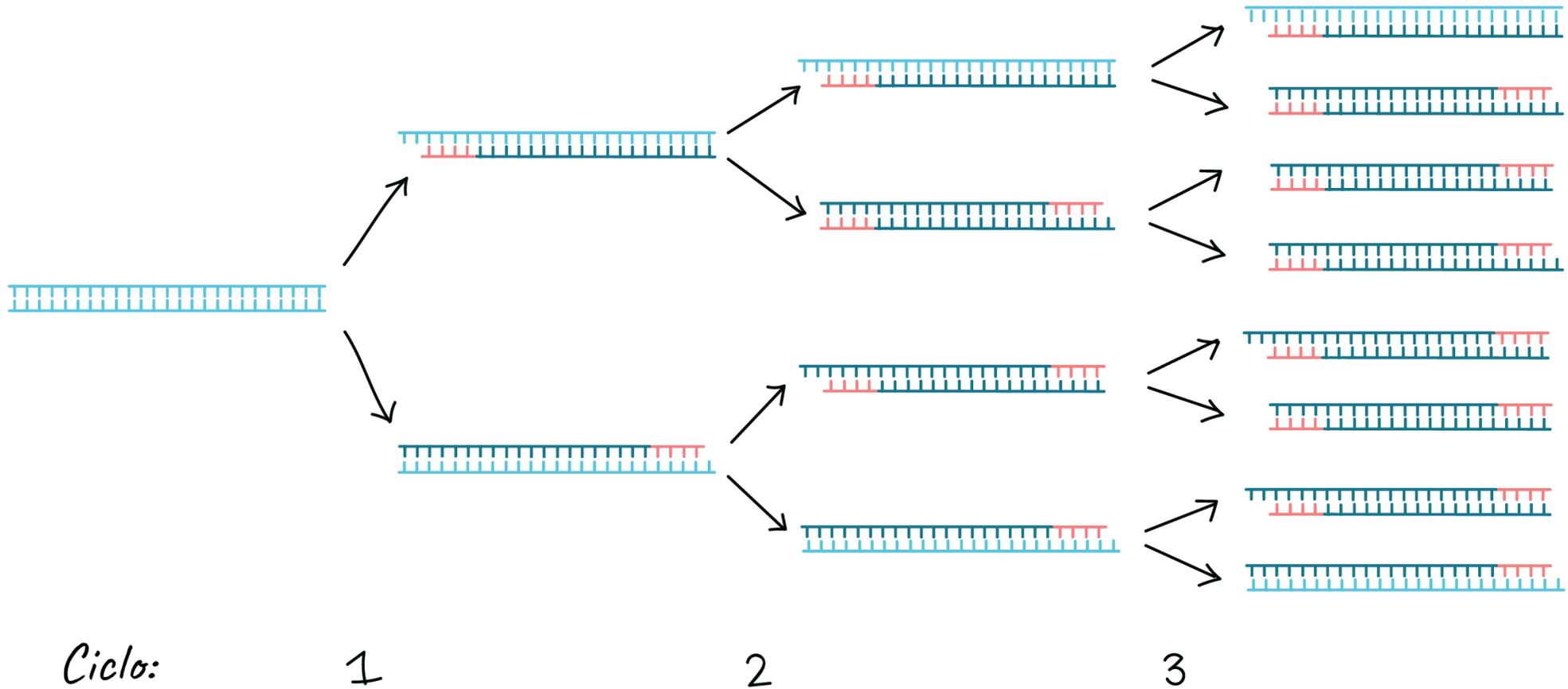
PCR - Reacción en cadena de la polimerasa



2. Detección directa

Genoma viral

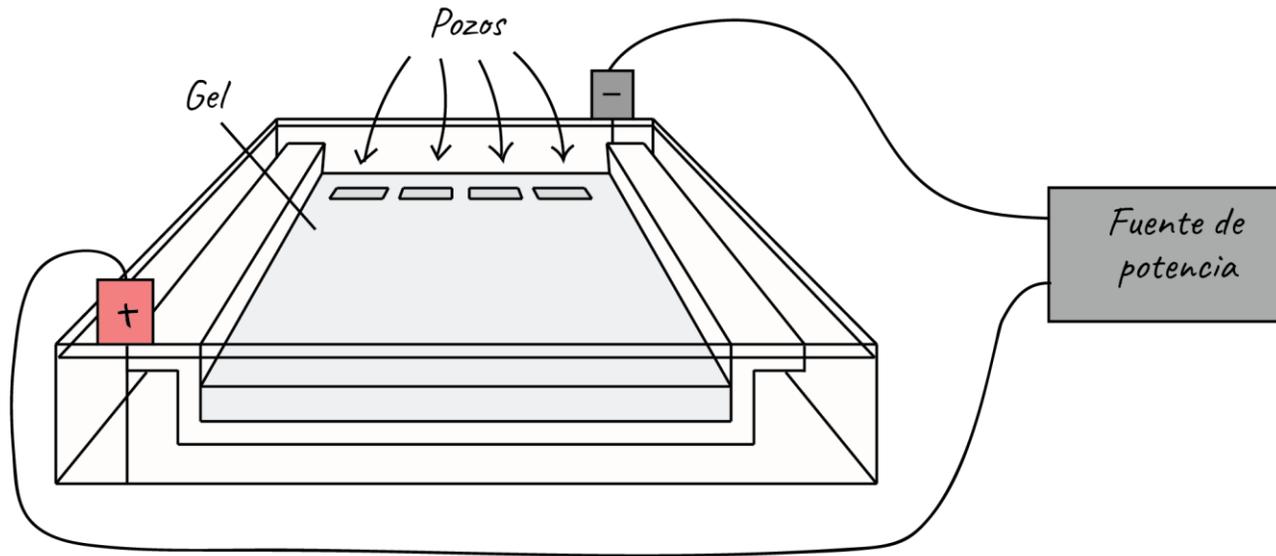
PCR - Reacción en cadena de la polimerasa



2. Detección directa

Genoma viral

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa



¿Qué pasa si es que el virus es de ARN?

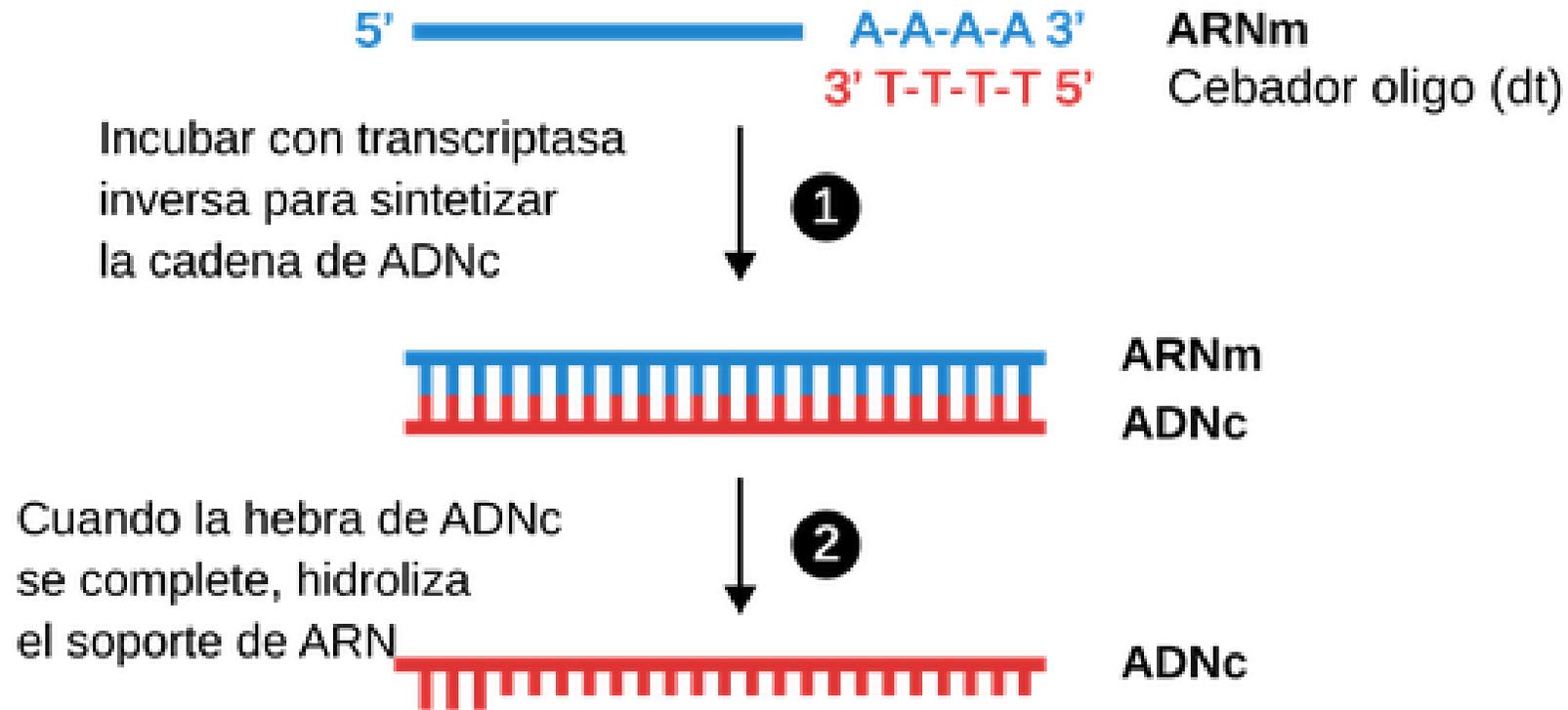


Importancia de + y -

2. Detección directa

Genoma viral

Retrotranscripción - PCR

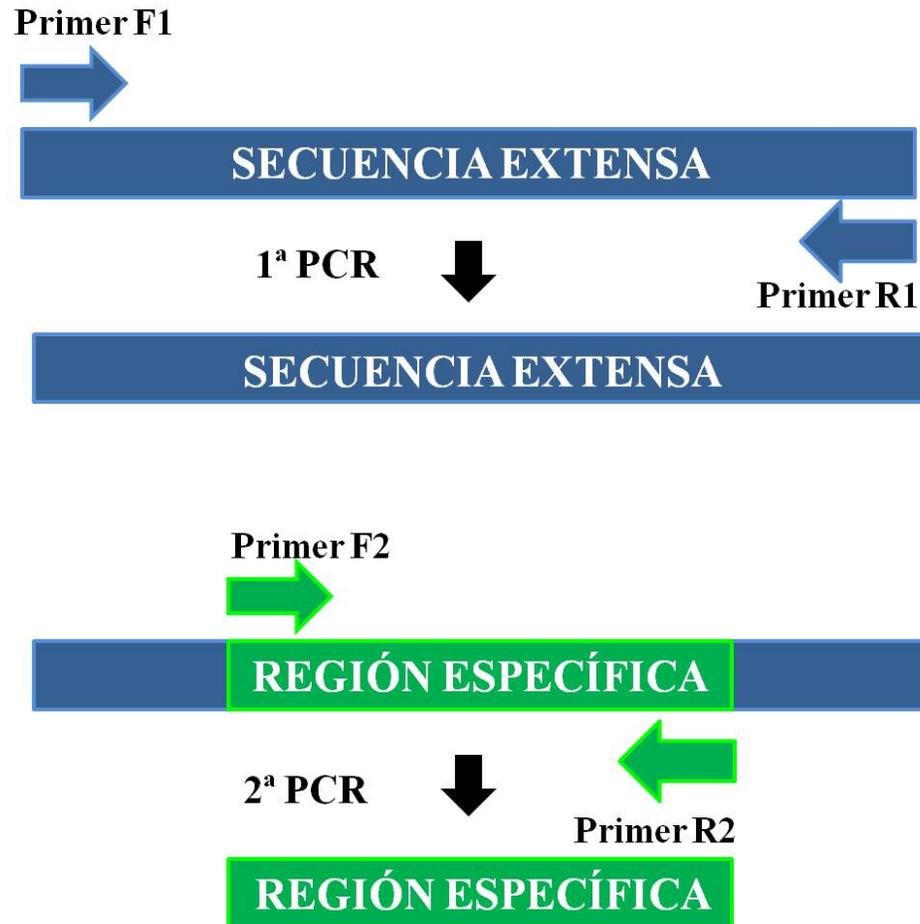


Se adiciona un paso de Retrotranscripción para convertir hacer una copia en ADN del ARNm del virus

2. Detección directa

Genoma viral

PCR anidada (nested PCR)



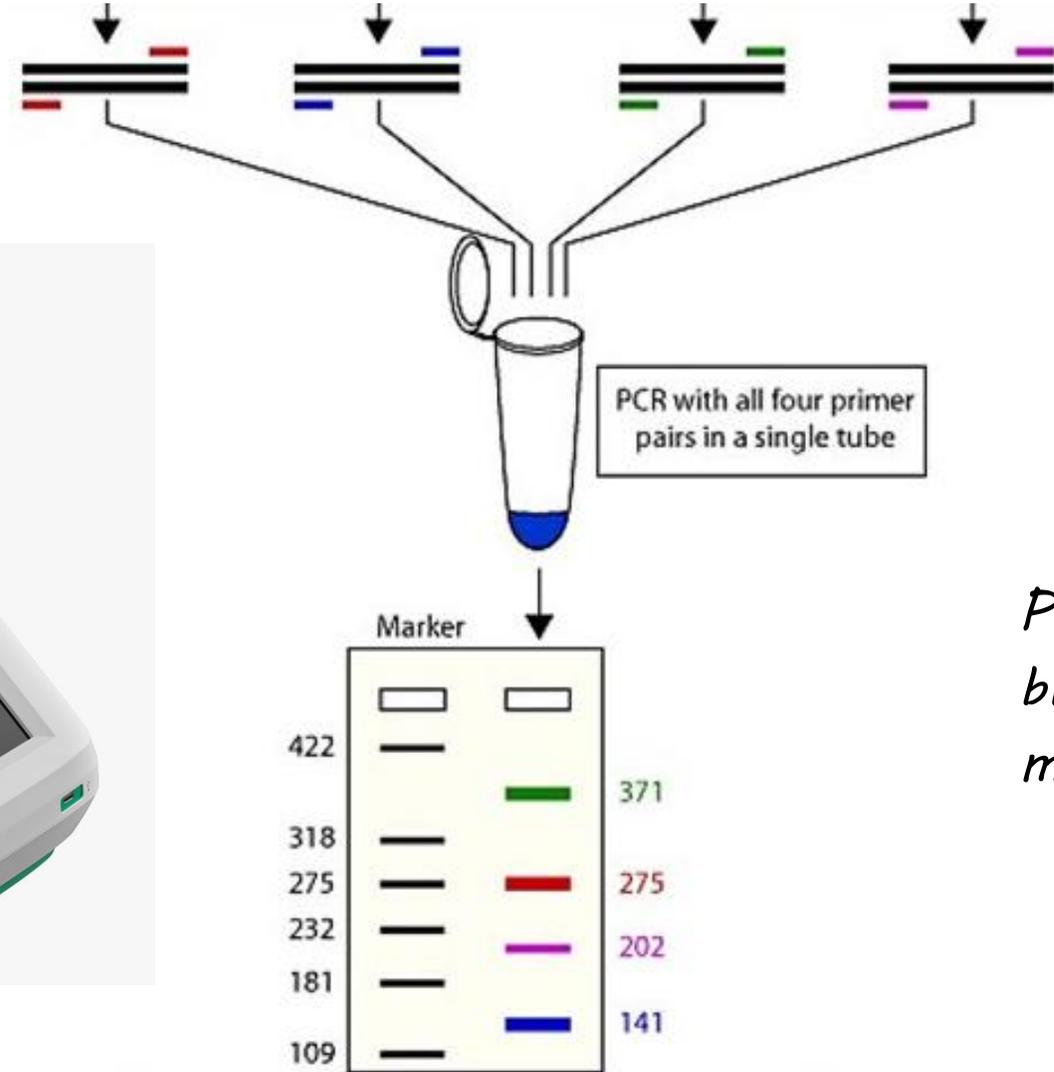
Aumenta la sensibilidad y especificidad de la detección



2. Detección directa

Genoma viral

PCR multiplex

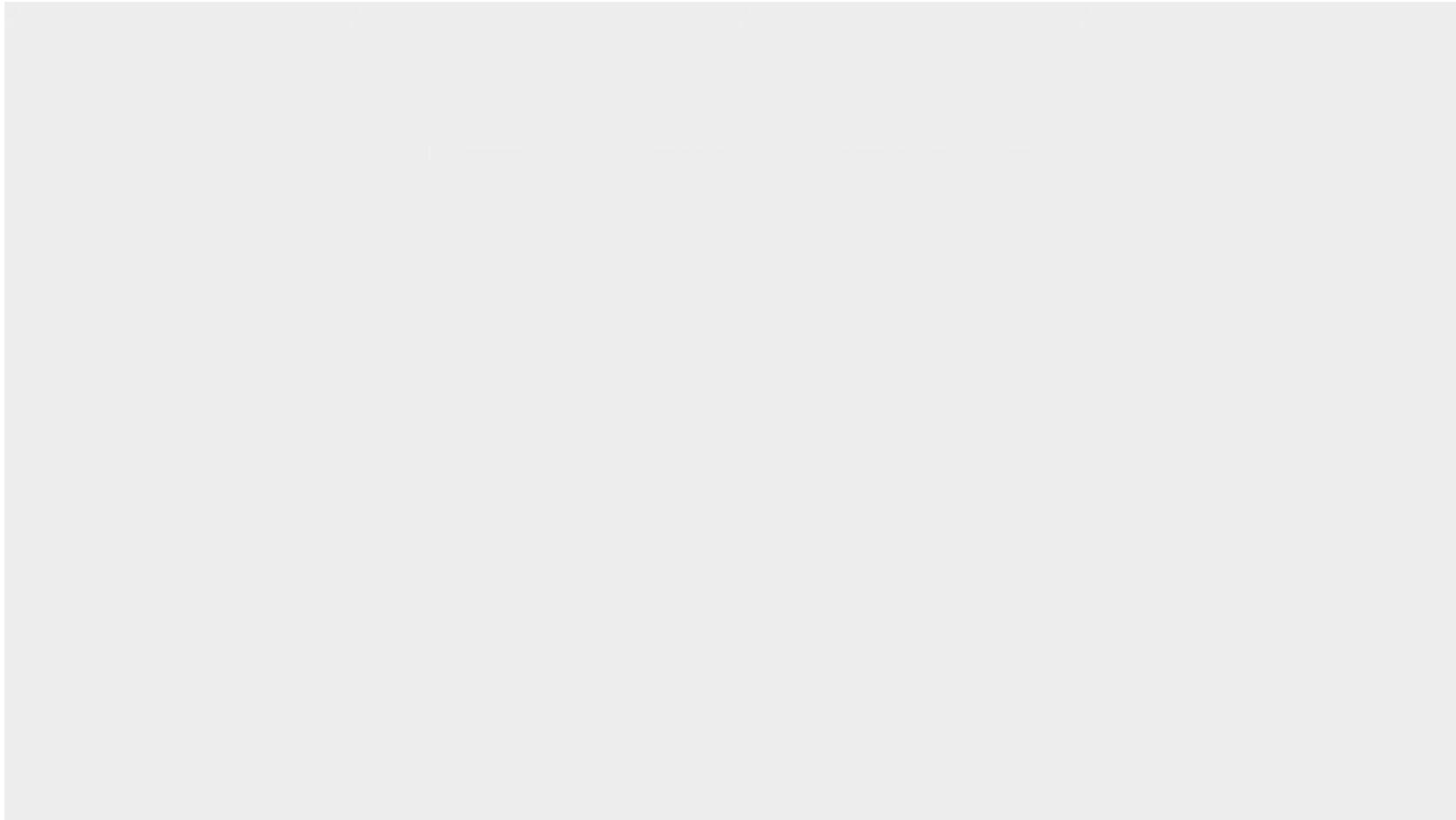


Permite amplificar distintos blancos a la vez en una muestra

2. Detección directa

Genoma viral

PCR en tiempo real (Real time PCR) - qPCR



2. Detección directa

Genoma viral

PCR en tiempo real (*Real time PCR*) - qPCR



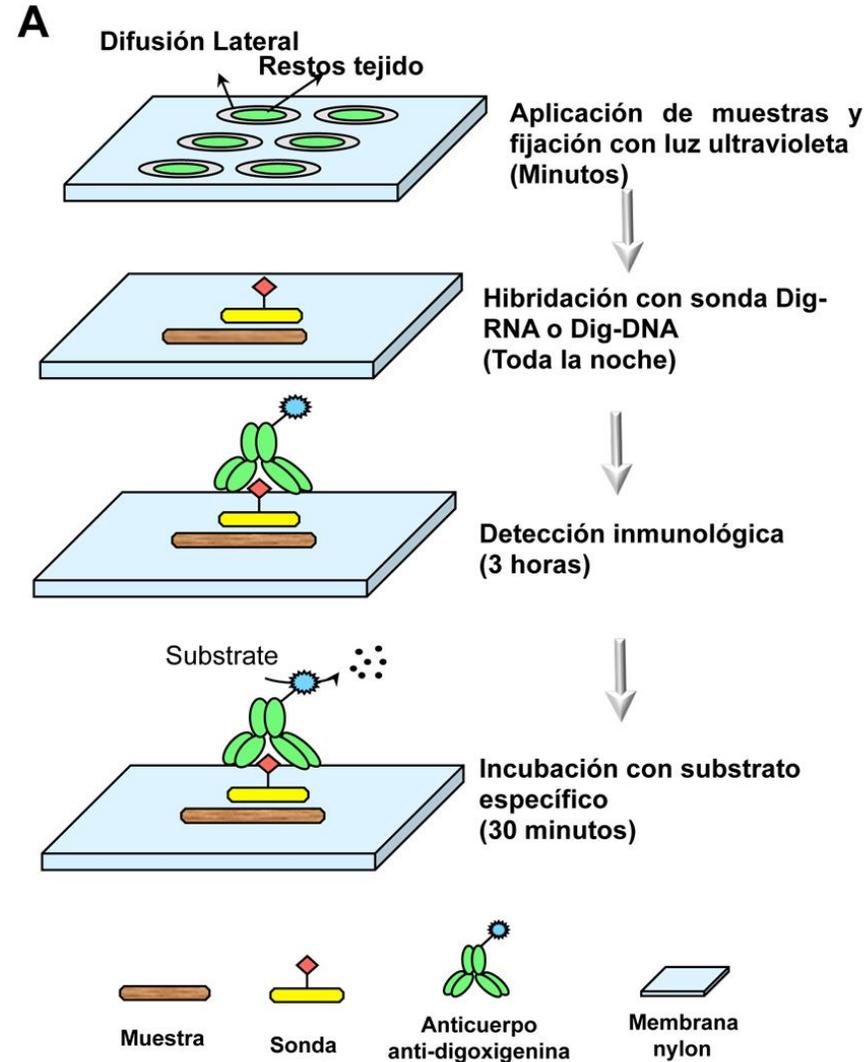
PCR convencional	PCR en tiempo real
Detecta un único segmento del ADN	Detecta y cuantifica el ADN
Amplificación y cuantificación del producto en dos fases	Amplificación y cuantificación en un solo paso
Menor sensibilidad	Mayor sensibilidad
Menor especificidad	Mayor especificidad
Equipos menos costosos	Equipos y reactivos más costosos (sondas fluorescentes más caras)



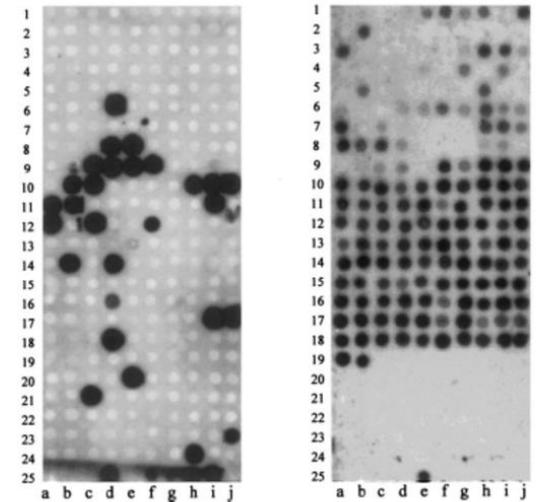
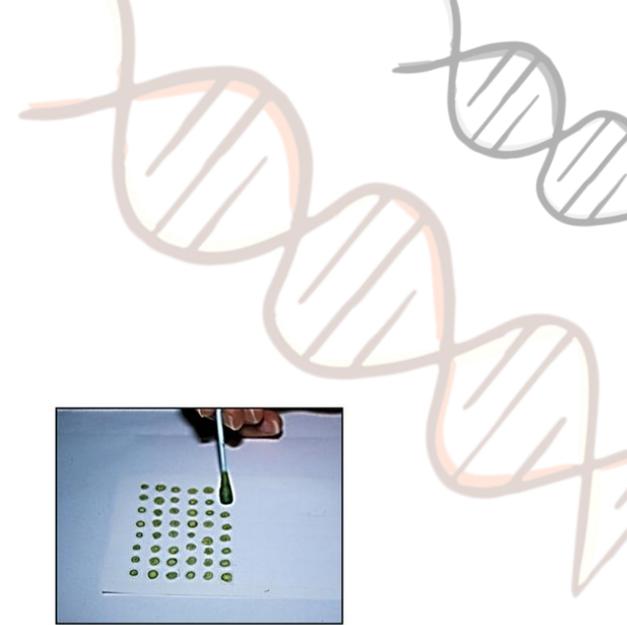
2. Detección directa

Genoma viral

Hibridación



B

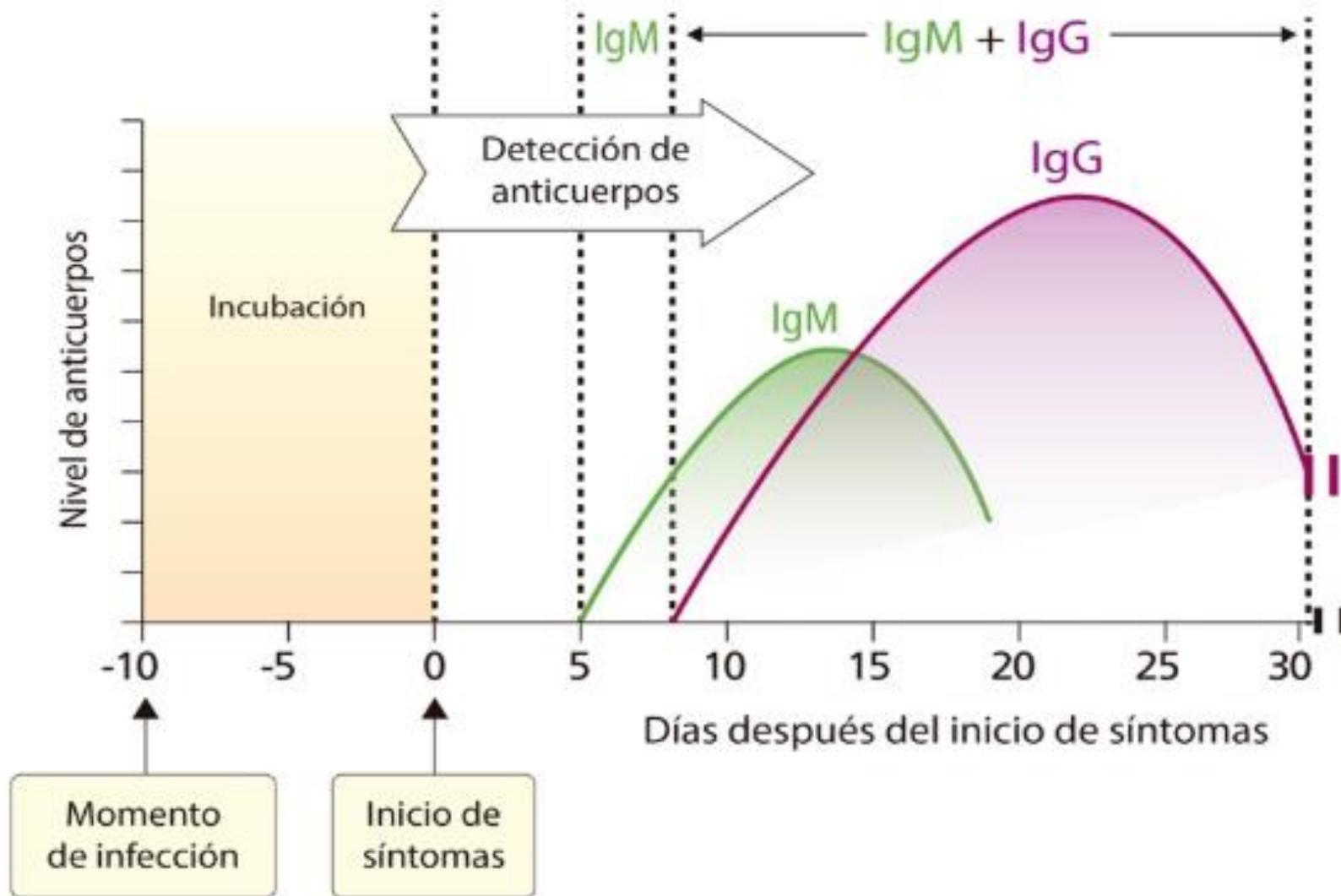


VIRUS de RNA
CarMV

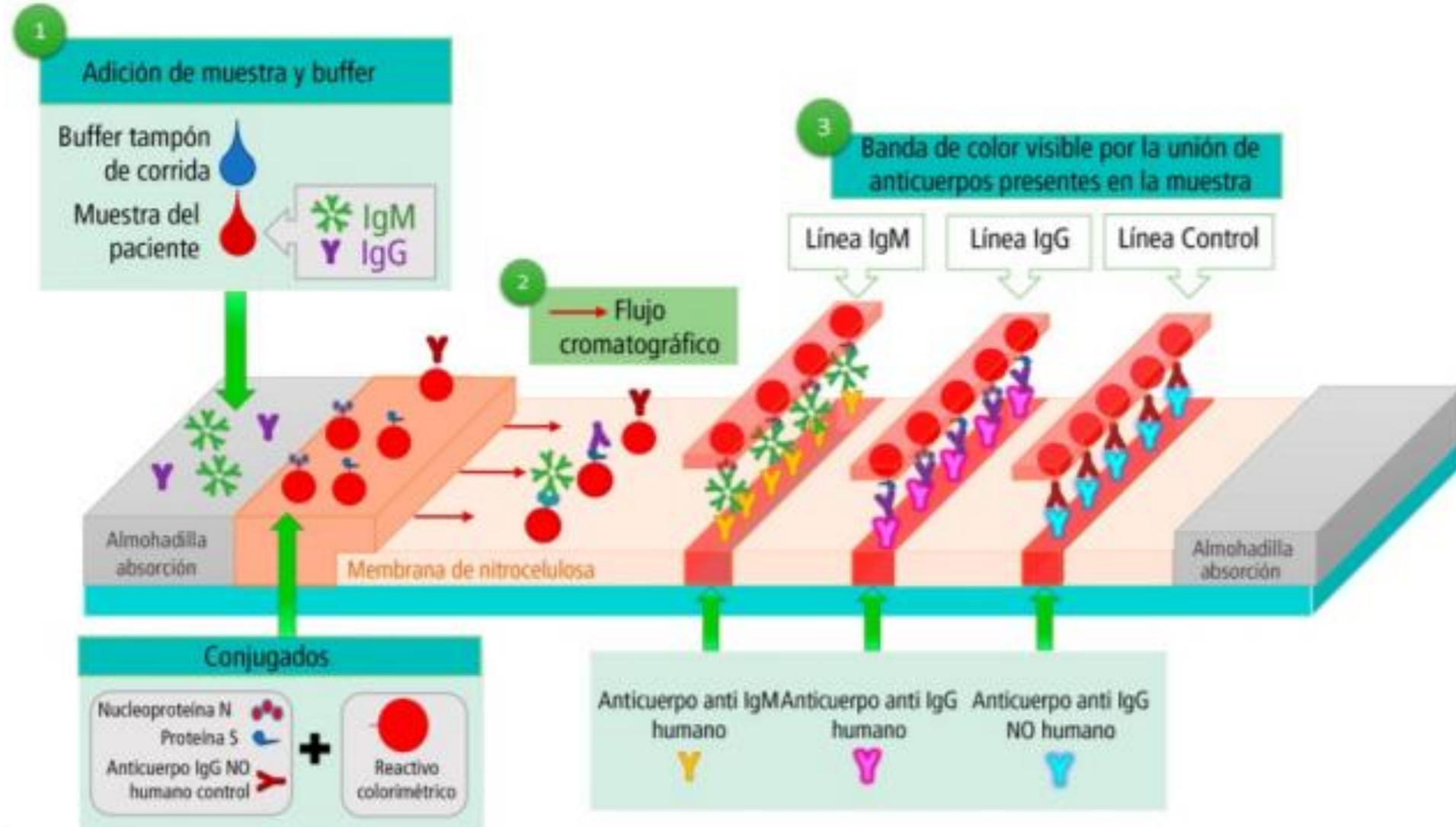
VIRUS de DNA
CERV

Revelado quimioluminiscente

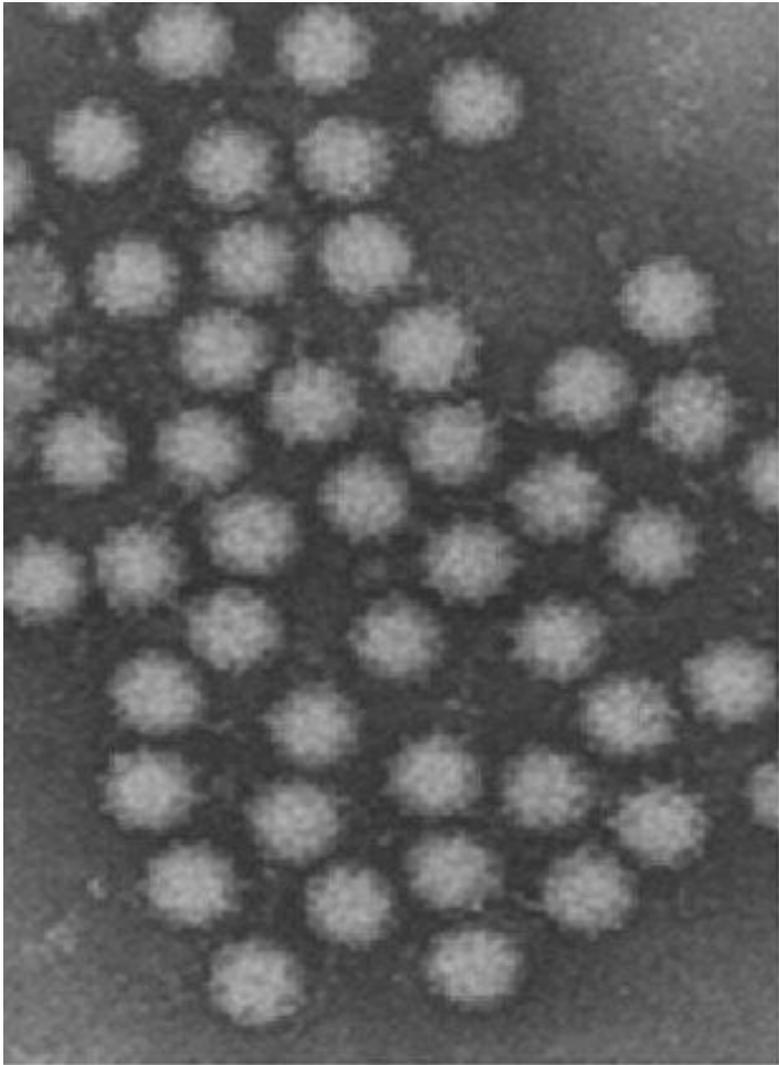
3. Detección de anticuerpos



3. Detección de anticuerpos



4. Observación directa de partículas virales



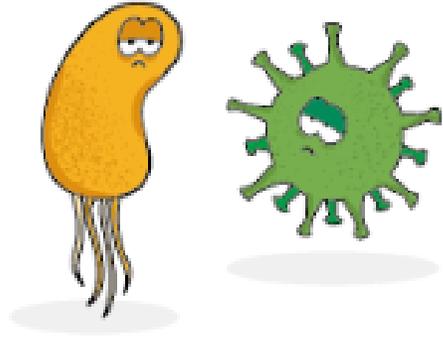
Virus RHDV



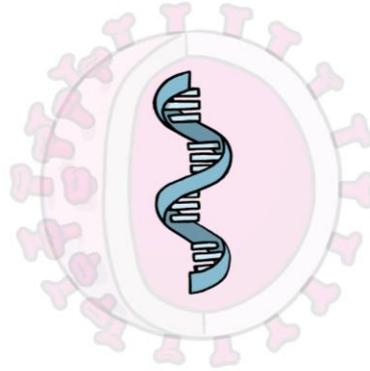
*Virus de la enfermedad
hemorrágica del conejo (RHDV)*

VACUNAS

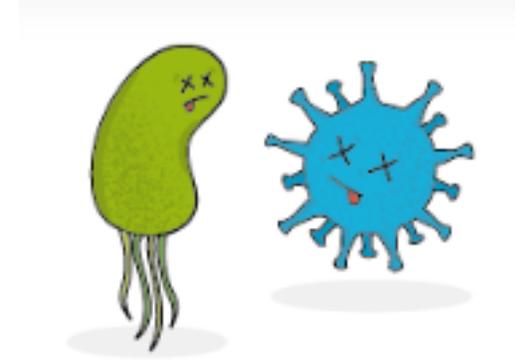
Clasificación



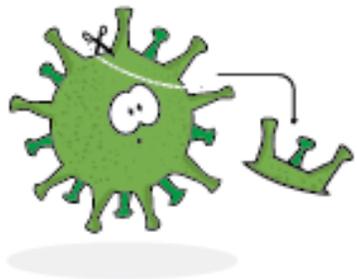
*Gérmenes vivos
atenuados*



*Vacunas de
ácidos nucleicos*



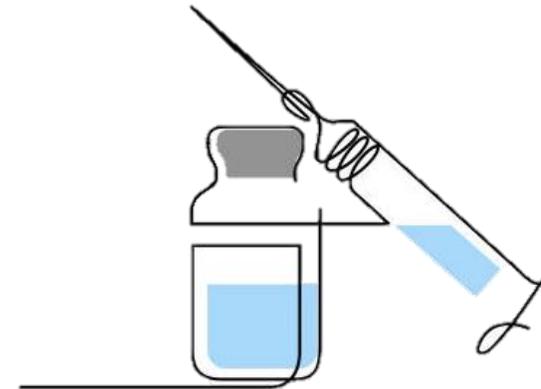
*Gérmenes muertos
o inactivados*



*Vacunas de
subunidades*



*Vacunas
toxoides*



VACUNAS

Vías de aplicación

Orales

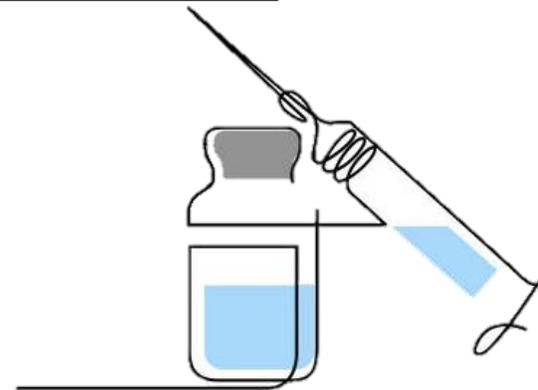
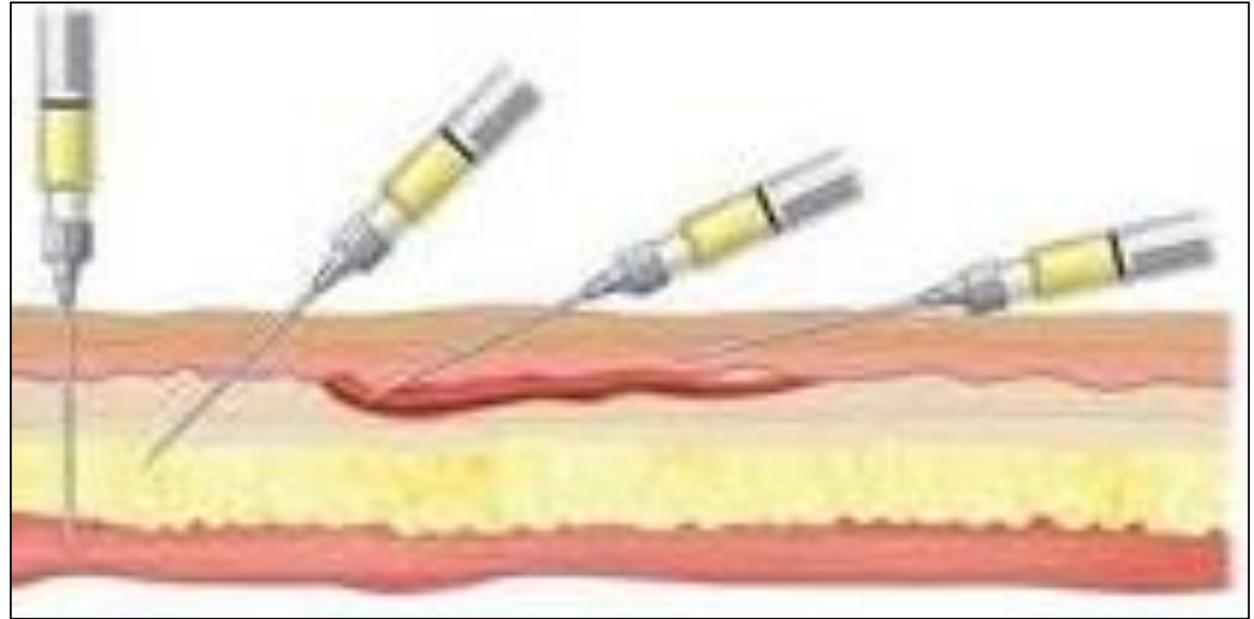
Parenterales

Intramuscular

Subcutánea

Intradérmica

Intravenosa





Muchas gracias!!

Cap. 17 y 76 - Stanchi
Cap. 68 y 70 - Vet. Microbiology

