



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**



TRABAJO ESPECIAL DE GRADUACION

**PASANTIA EN LABORATORIO CENTRAL DE
DIAGNOSTICO VETERINARIO Y
MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS (LCDVMA) IPSA 2015-
2016**

Autor

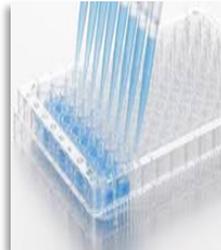
Karla Adriana Mendoza Hernández

Asesores

DMV. Deleana Del Carmen Vanegas. Msc.

Ing. Carlos Ruiz Fonseca. Msc.

Managua, Nicaragua 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

**FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADUACION

**PASANTIA EN LABORATORIO CENTRAL DE
DIAGNOSTICO VETERINARIO Y
MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS (LCDVMA) IPSA
2015-2016**

Autor

Karla Adriana Mendoza Hernández

Asesores

DMV. Deleana Del Carmen Vanegas. Msc.

Ing. Carlos Ruiz Fonseca. Msc

Managua, Nicaragua 2016

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la Decanatura de la Facultad de Ciencia Animal, como requisito parcial para optar al título profesional de:

Médico Veterinario
En el grado de Licenciatura

Miembros de tribunal examinador:

Dra. Karla Ríos Reyes

Presidente

Dr. William Oporta

Secretario

Dr. Junior Raxa Chavarría

Vocal

Asesores:

DMV. Deleana del Carmen Vanegas. Msc.

Ing. Carlos Ruiz Fonseca. Msc.

Sustentante:

Karla Adriana Mendoza Hernández.

AGRADECIMIENTOS A:

Dios: « Mi refugio y fortaleza, mi Dios, en quien confío» Que él te libra de la red del cazador, de la peste funesta; con sus plumas te cubre, y bajo sus alas tienes un refugio: escudo y armadura es su verdad.

Mi familia: *Por su apoyo incondicional que me permitió culminar mis estudios universitarios. Mi soporte en los momentos que más los necesite.*

Paula Hernández Izaguirre.
Carlos José Mendoza.
Aura Estela Mendoza.
Dominga Hernández Izaguirre.

Universidad Nacional Agraria (UNA): *Por ser la Institución en que me forme y despertó en mi la pasión por la Medicina Veterinaria.*

Asesores: *Por su soporte, gentileza, ayuda incondicional y compromiso que tienen con sus estudiantes al dedicar su tiempo valioso en pro de la formación integral.*

DMV. Deleana Del Carmen Vanegas.Msc.
Ing. Carlos Ruiz Fonseca. Msc.

*A mis queridas amigas por su apoyo durante esta pasantía, **MV. Ingrid Hernández Garibo** y **Lic. Ruth López Aguirre**, compartiendo su conocimiento como analistas del área de virología, enseñarme el trabajo en equipo y la responsabilidad del mismo.*
*Área de Parasitología: **MV. Sandra Narváez.** **MV. Cecilia Ulloa.***

Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario y Microbiología de los Alimentos
(LCDVMA) IPSA.

INDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCION	1
II. CARACTERIZACION DE LA INSTITUCIÓN.....	4
III. FUNCIONES DEL AREA DE TRABAJO	12
IV. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DESARROLLADO.....	14
4.1 Metodología de Lavado y Esterilización de Materiales.....	14
4.2 Lavado de material contaminado.....	15
4.2.1 Puntas y placas	16
4.3 Lavado de Material no Contaminado.....	16
4.4 Limpieza de Cabina de Bioseguridad tipo II.....	17
4.4.1 Desinfección de las cabinas	18
4.4.2 Toma de Hisopados.....	18
4.5 Diagnostico de enfermedad Newcastle en aves inoculadas experimentalmente mediante biología molecular utilizando RT-PCR tiempo real en el LCDVMA	20
4.5.1 Enfermedad de Newcastle.....	20
4.5.2 Objetivo general de trabajo experimental RT-PCR tiempo real Newcastle.....	23
4.5.3 Objetivos específicos.....	23
4.5.4 Diagnóstico de enfermedad de Newcastle en Nicaragua.....	23
4.5.5 En Aislamiento viral.....	24
4.5.6 Diagnostico de enfermedad Newcastle hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación.....	25
4.5.7 Hemaglutinación	25
4.5.8 Inhibición de la hemaglutinación	26
4.5.9 PCR como método de diagnóstico.....	27
4.5.10 Detección del virus de enfermedad Newcastle en muestras usando PCR tiempo real.....	28
4.6 Metodología usada en trabajo experimental con aves para implementación de RT-PCR tiempo real para diagnóstico de enfermedad Newcastle LCDVMA.	32
4.6.1 Extracción de ácidos Nucleicos según protocolo QIAGEN RNeasy utilizado enLCDVMA.....	37

4.6.2 Protocolo Extracción de ácidos nucleicos de Hisopados Cloacales 4 Aves Vacunadas.	38
4.6.3 Amplificación de muestras según Protocolo Matriz RT-PCR para APMV en LCDVMA.....	38
4. 6.4 Cálculos de Reactivos para Amplificación Mezcla de PCR-RT Para APMV-MATRIX según protocolo LCDVMA.	39
4.6.5 Protocolo amplificación en termociclador AB: Applied Biosystems 7500 real time Newcastle.....	40
4. 6.6 Amplificación de extracciones de ARN para diagnóstico de Newcastle.....	41
4.7 Materiales y equipos etilizados para implementación de técnica RT-PRC tiempo real para diagnosticar enfermedad Newcastle.	43
4.8 Cronograma de actividades de trabajo experimental con aves	45
4.9 Presupuesto	46
V. RESULTADOS OBTENIDOS	49
VI. LECCIONES APRENDIDAS	51
VII. CONCLUSIONES	53
VIII. RECOMENDACIONES	54
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA	55
X. ANEXO	57

INDICE DE CUADRO

Cuadro 1. Identificación de aves vacunadas experimentalmente por números y colores...	33
Cuadro 2. Mezcla master de PCR-RT para APMV- matrix.....	39
Cuadro 3. Sondas y frecuencia de iniciador APMV- matriz	40
Cuadro 4. Perfil Taqman PCR (APVM).....	40
Cuadro 5. Resultados de primera amplificación de gallina 1,2,3,4.....	41
Cuadro 6. Resultados de segunda amplificación gallina 1,2,3,4.....	42
Cuadro 7. Cronograma de trabajo RT-PCR Tiempo Real Newcastle Noviembre-Diciembre 2015.	45
Cuadro 8. Presupuesto de equipos y materiales para diagnóstico de enfermedad Newcastle mediante técnica RT-PCR	46

INDICE DE FIGURAS Y FOTOGRAFIAS

Figura 1. Signos neurológicos, tortícolis, torsión lateral de la cabeza y el cuello.....	21
Figura 2. El virus de Newcastle puede ocasionalmente infectar a humanos causando conjuntivitis.....	22
Figura 3. Marcadores fluorescentes.....	30
Figura 4. Diagrama esquemático en el que se muestra el principio del RT-PCR tiempo real usando TagMan.....	31
Fotografía.1 Vacuna Newcastle utilizada en el experimento.....	32
Fotografía.2. Hisopado cloacales en aves vacunadas experimentalmente.....	34
Fotografía.3Trasvase de muestras de hisopados cloacales.....	35
Fotografía.4. Centrifuga 5415R utilizada en área de extracción.....	36

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Edema severo en cabeza y en ojo conjuntivitis severa con edema de córnea...	57
Anexo 2. Diarrea característica de Newcastle, pigmento biliar verde y uratos blancos...	57
Anexo 3 Baja calidad, cascara blanda, rugosa o deformación de los huevos.....	58
Anexo 4. Edema peri orbital que produce forma facial cuadrada.....	58
Anexo 5. Cabina de bioseguridad tipo II Escó (trasvase de solución TBTB 33T).....	59
Anexo 6. Balanza analítica.....	59
Anexo 7. Centrifuga 5415R, 5415D (Eppendorf).....	60
Anexo 8. Cabina de bioseguridad tipo II (The Clone Zone).....	60
Anexo 9. Equipo Applied Biosystems 7500.....	61

RESUMEN

La realización de pasantías tienen un componente formativo, una pasantía debe dar la oportunidad a los jóvenes de aprender calificaciones prácticas que causarán una buena impresión sobre los potenciales empleadores. Seis meses de pasantías en el Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario y Microbiología de Alimentos IPSA en el área de Virología se fundamentó los tres meses iniciales en la Inducción a técnicas utilizadas en análisis de muestras para el diagnóstico de enfermedades virales tales como: Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), Peste Porcina Clásica (PPC), Circovirus Porcino, Enfermedad de Aujeszky, Diarrea Viral Bovina (BVDV), Fiebre del Nilo Occidental, La Enfermedad de Newcastle (EN), Laringotraqueitis Infecciosa Aviar (LTI), Bronquitis Infecciosa Aviar (BIA), Virus de la Enfermedad de la Cabeza Amarilla (YHV), El virus del Síndrome de Taura (TSV), Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética infecciosa (IHHNV), Bacteria de la Necrosis Hepatopancreática (NHPB), Virus Mionecrosis Infecciosa (IMNV), Nodavirus del *Penaeus Vannamei* (PVNV), Virus Mancha Blanca (WSSV), correcto manejo de las muestras, uso de equipos en el área de virología, realización de tareas de desinfección y esterilización de materiales que se utilizan, manejo de documentación en solicitudes de análisis de muestras y resultados emitidos para mantener la trazabilidad de las mismas. Tres meses posteriores de la pasantía enfocado a un trabajo experimental que se realizó con 4 aves utilizando biología molecular en el estudio de ácidos nucleicos para implementación de una nueva técnica de diagnóstico en el área de Virología para la enfermedad aviar de Newcastle mediante PCR tiempo real ; en la cual lleve un seguimiento desde la elaboración del cronograma de actividades, vacuna de las aves, recolección de muestras por tres semanas, elaboración de bitácora del experimento, presupuesto de equipos y materiales, hasta su extracción y amplificación de ácidos nucleicos en un termociclador. (bajo supervisión del jefe de área) a través de la cadena polimerasa con el objetivo de hacer un aporte en extender el conocimiento de manejo de esta técnica en la Facultad de Ciencia Animal tan actual y para el laboratorio se sustenta la relevancia del experimento, en una necesidad tangible para ser competitivos con el mercado internacional y garantizar la inocuidad de los productos destinados a consumo humano un servicio con mayor rapidez debido a la relevancia de la enfermedad en un país con una economía insipiente donde Nicaragua es libre con vacunación de dicha enfermedad y por el cual necesitamos mantener dicho estatus a nivel internacional mediante pruebas más sensibles que vayan acorde con los requisitos estipulados por la OIE.. La pasantía me permitió la oportunidad de aplicar los conocimientos adquiridos en la Universidad Nacional Agraria, intercambiando información científica e investigación sobre temas innovadores como el de biología molecular en el estudio de ácidos nucleicos. Realizando un conjunto de actividades de carácter teórico – práctico, en este caso en un ente estatal Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario y Microbiología de Alimentos (LCDVMA) IPSA, a fin de aplicar y complementar los conocimientos en el campo específico de trabajo, colaborar en la solución de problemas y adquirir experiencias laborales.

Palabras claves: Pasantía, laboratorio, enfermedades virales, diagnóstico, ácidos nucleicos, enfermedad de Newcastle, aislamiento viral, RT-PCR tiempo real.

ABSTRACT

Interning have a training component, an internship should provide the opportunity for young people to learn practical skills that will cause a good impression on potential employers. Six-month internship at Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario y Microbiología de Alimentos IPSA (veterinary laboratory) in virology area was based the initial three-month in induction of techniques used in analyzing samples for the diagnosis of viral diseases such as Respiratory Syndrome Porcine Reproductive (PRRS), Classical Swine Fever (CSF), Porcine Circovirus, Aujeszky's disease, Bovine Viral Diarrhea (BVDV), West Nile fever, Newcastle disease (EN), laryngotracheitis Avian Infectious (LTI), Infectious Bronchitis Fowl (BIA) virus disease Yellow Head (YHV) Virus Taura Syndrome (TSV) virus Hypodermic Necrosis and Infectious Hematopoietic (IHHNV), Bacterium Necrosis Hepatopancreatic (NHPB) virus IMN (IMNV) , Nodavirus of Penaeus Vannamei (PVNV) Virus White Spot (WSSV), correct handling of the samples, use of equipment in the field of virology, performing tasks of disinfection and sterilization of materials used, handling documentation requests sample analysis and results issued to maintain traceability of them. Three months internship focused on experimental work carried out with 4 birds using molecular biology in the study of nucleic acids for implementation of a new diagnostic technique in the field of virology for avian Newcastle disease using real-time PCR; in which lead track from the development schedule of activities, vaccine birds, collecting samples for three weeks, preparing log of the experiment, budget equipment and materials, until extraction and nucleic acid amplification in a thermocycler. (Under supervision of the head of area) through polymerase chain with the aim of making a contribution in spreading knowledge management technique at the Faculty of Animal Science as current and for the laboratory the relevance of the experiment is based, in a tangible need to be competitive with the international market and ensure the safety of products intended for human consumption service more quickly due to the relevance of the disease in a country with an incipient economy where Nicaragua is free with vaccination for that disease and which we need to maintain that status internationally by more sensitive tests that go in line with the requirements stipulated by the OIE. The internship allowed me the opportunity to apply the knowledge acquired at the National Agrarian University, exchanging scientific information and research on innovative topics such as molecular biology in the study of nucleic acids. Performing a set of activities theoretical - practical, in this case a state entity, Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario y Microbiología de Alimentos IPSA to implement and supplement the knowledge in the specific field of work, collaborate in the troubleshooting and gain work experience.

Keywords: Internship, laboratory, viral diseases, diagnosis, nucleic acids, Newcastle disease, viral isolation, real-time RT- PCR.

I. INTRODUCCION

La realización de pasantías tiene un componente formativo. Utilizando jóvenes estudiantes para llevar a cabo tareas que normalmente son realizadas por el personal estable de dicha institución, una pasantía debe dar la oportunidad a los jóvenes de aprender calificaciones prácticas que causarán una buena impresión sobre los potenciales empleadores.

La globalización mundial de las economías ha resaltado la importancia de la Sanidad Animal en el intercambio comercial, por la presencia de enfermedades exóticas o de control primario que afectan el intercambio de productos y subproductos entre los países que cuentan con tratados de libre comercio. La industria avícola como fuente productora de proteína es una actividad que genera una importante cantidad de recursos líquidos debido a el ciclo corto de explotación, conversión y disposición de productos como huevo y carne que gozan de gran demanda en el mercado Nicaragüense.

La realización de seis meses de pasantías en el Laboratorio Central de Diagnostico Veterinario y Microbiología de Alimentos (LCDVMA) IPSA, comprendía un horario de lunes a viernes de 08:00 am -04:45 pm. Se dividió en dos momentos cruciales:

El primero comprende un periodo de tiempo de tres meses durante el cual la primera semana fui ubicada en el área de lavado bajo dirección de la señora María Auxiliadora Soto. Realizando recepción de materiales sucios de todas las áreas del laboratorio, llevando un control en bitácora, lavado de materiales sucios contaminados y no contaminados (beakers, pipetas serológicas, morteros, brazos, tubos de ensayo, platos Petri, pipetas pasteur, frascos de vidrio, viales, placas para ELISA, puntas, erlenmeyer, probetas, pinzas, tijeras, espátulas, tanto de material plástico como de vidrio), empaquetado con papel Kraft , así como también esterilización de la mismos y posterior entrega en las áreas que hicieron la solicitud de ese lavado.

Durante dos meses y tres semanas, fui ubicada en el área de virología bajo supervisión de la Médico Veterinario Maryuri Mayorga para inducirme a conocimientos de forma concisa y precisa acerca de la metodología de trabajo en el área de Virología, y apropiarme de las técnicas utilizadas en análisis de muestras para el diagnóstico de enfermedades virales en porcinos, aves, bovinos y equinos comprendiendo un sinnúmero de actividades a realizar para desarrollar destrezas y servir como apoyo en dicha área con tanta carga de trabajo.

Estas actividades contemplaron desde la limpieza del área antes de iniciar con el proceso de análisis con alcohol al 70%, chequeo de temperaturas en el área de Freezers e incubadoras dos veces al día, entrega de materiales sucios a el área de lavado, la recepción de las solicitudes de muestras, reflejarlas en las bitácoras correspondientes a tipo de análisis, revisión de la viabilidad de las muestras, rotulado y trasvase, almacenamiento y descarte de las mismas a temperaturas adecuadas. Limpieza de freezer, Manejo de documentación en solicitudes de análisis de muestras y resultados emitidos para mantener la trazabilidad de las mismas verificando cada uno de los datos reflejados en los resultados antes de pasarlos a firma.

Aprendiendo y realizando manejo adecuado de equipos en el área, esencial para agilizar el trabajo entre estos equipos estaban: Manipulación adecuada de lector de Placas ELISA llenado de datos, calibrado y toma de lectura de medios en PH meter, Cabinas de bioseguridad tipo II desde su limpieza y desinfección hasta correcto trasvase de muestras y medios en ellas, pesado y macerado de órganos de porcinos y aves, apertura de huevos para aislamiento viral, elaboración de glóbulos rojos al 5%, realización de electroforesis para técnica PCR punto final.

Vortex y centrifugado de muestras para aislamiento viral en centrifugas tanto refrigerada a 4°C como las convencionales, realización de todo el proceso para Aislamiento viral desde la recepción de huevos SPF, limpieza, ovos copiado, rayado, rotulado, almacenamiento (posterior a su inoculación por un analista) seguimiento de la viabilidad de los embriones mediante ovos copiado y toma de temperatura de la incubadora dos veces al día, pesado de agarosa, elaboración de agar gel al 2%, monta de muestras para análisis de Laringotraqueitis aviar, Diarrea Viral Bovina.

Inducción a análisis ELISA, PRC convencional para diagnosticar PPC, PCR tiempo real para diagnosticar Newcastle, Aislamiento Viral, prueba de controles para kit de Paratuberculosis, reconstitución de vacunas a ser utilizadas como controles positivos. Lavado de cincuenta y ocho mil cuatrocientas sesenta y cuatro puntas (38,464), Colocar en cajas cincuenta y ocho mil cuatrocientas sesenta y cuatro puntas (38,464), Lavado de 1340 placas así como su almacenaje posterior, Trasvase de alcohol para muestras de camarón en tubos, entrega de materiales para recolección de muestras a veterinarios de campo. Ordene y rotule el área del nivel II, Limpieza del nivel III. Rotulado de muestras en el área de Serología. Rotulado de viales para hisopados cloacales, trasvase de hisopados cloacales.

Tres meses de la pasantía me delegaron hacer un trabajo experimental que se realizó con 4 aves utilizando biología molecular en el estudio de ácidos nucleicos para implementación de una nueva técnica de diagnóstico en el área de Virología para la enfermedad aviar de Newcastle mediante PCR tiempo real ; en el cual tenía la responsabilidad de llevar un seguimiento desde la elaboración del cronograma de actividades, vacuna de las aves, recolección de muestras por tres semanas, iniciando el 26 de noviembre del 2015 el experimento y terminando con las extracciones y amplificaciones de los ácidos nucleicos el 10 de febrero del 2016, elaboración de bitácora del experimento, presupuesto de equipos y materiales, hasta su extracción y amplificación de ácidos nucleicos por mi persona (bajo supervisión del jefe de área).

A través de la cadena polimerasa con el objetivo de hacer un aporte en extender el conocimiento de manejo de esta técnica tan innovadora sobre el estudio de ácidos nucleicos en la Facultad de Ciencia Animal en la Universidad Nacional Agraria , Realizando un conjunto de actividades de carácter teórico – práctico, en este caso en un ente estatal Laboratorio Central de Diagnostico Veterinario y Microbiología de Alimentos (LCDVMA) IPSA, a fin de aplicar y complementar los conocimientos en el campo específico de trabajo, colaborar en la solución de problemas y adquirir experiencias laboral.

Con la implementación de la técnica RT-PCR tiempo real mediante un trabajo experimental con aves para diagnosticar enfermedad de Newcastle a través de la cadena polimerasa se podrá realizar un diagnóstico con mayor rapidez, sensibilidad , seguridad y especificidad debido a la relevancia de la enfermedad y el tiempo que toma emitir un resultado mediante aislamiento viral del cual se requiere en muchos casos de múltiples pases, en un país con una economía insipiente, donde ese tiempo tan valioso es traducido en ganancias o pérdidas económicas, somos un país libre con vacunación de dicha enfermedad y por el cual necesitamos mantener dicho estatus a nivel internacional mediante pruebas más sensibles y que vayan acorde con los requisitos estipulados por la OIE

Es por estas razones de peso en que se sustenta la relevancia del experimento, en una necesidad tangible para ser competitivos con el mercado internacional y garantizar la inocuidad de los productos destinados a consumo humano con una mayor rapidez y eficiencia en la emisión de resultados para quienes solicitan este servicio.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. Se ha convertido en el método de elección de muchos investigadores para los estudios genéticos y de biología molecular. Con la técnica de PCR es posible amplificar un segmento de ADN de manera exponencial, ya que después de cada ciclo se duplica la cantidad de ADN que existe si la reacción ocurre con máxima eficiencia.

Esta técnica es conocida como RT- PCR en tiempo real y se ha convertido en el método más popular para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero (REDVET 2009). Todo esto demuestra que la técnica de PCR en tiempo real permite cuantificar con alta precisión tanto los niveles de ADN como los de ARN. (PCR en tiempo real 2006)

La técnica PCR a tiempo real nos ofrece como ventajas su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Si el equipo empleado es el Light Cyler o equivalente, esta ventaja todavía es más acusada, pudiéndose completar el proceso de amplificación y detección en 30 - 40 minutos. Estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos. Otra ventaja muy importante de la PCR a tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante.

II. CARACTERIZACION DE LA INSTITUCIÓN

El Laboratorio Central de Diagnostico Veterinario y Microbiología de Alimentos (LCDVMA) IPSA, es dedicado al estudio integral de las enfermedades animales mediante la aplicación de análisis, realizados por medio de diferentes técnicas, tratando de relacionar los resultados obtenidos en el laboratorio con las observaciones clínicas de los animales, las condiciones de manejo y del medio ambiente que rodean a los mismos. Está ubicado en el kilómetro 12.7 carretera sur, entrada a Serranías, 3 cuadras, al Oeste, 1 cuadra al Norte, 2 km al Noroeste; Managua- Nicaragua.

Su **misión** es la de Contribuir a la satisfacción de las necesidades de los usuarios, a través de los servicios de diagnóstico veterinario y diagnóstico microbiológico de alimentos en productos y subproductos de origen animal y vegetal, brindados de forma oportuna, los que cumpliendo los estándares científico técnicos establecidos por los organismos nacionales e internacionales, contribuyen a garantizar la protección del patrimonio Agropecuario de Nicaragua e Inocuidad agroalimentaria.

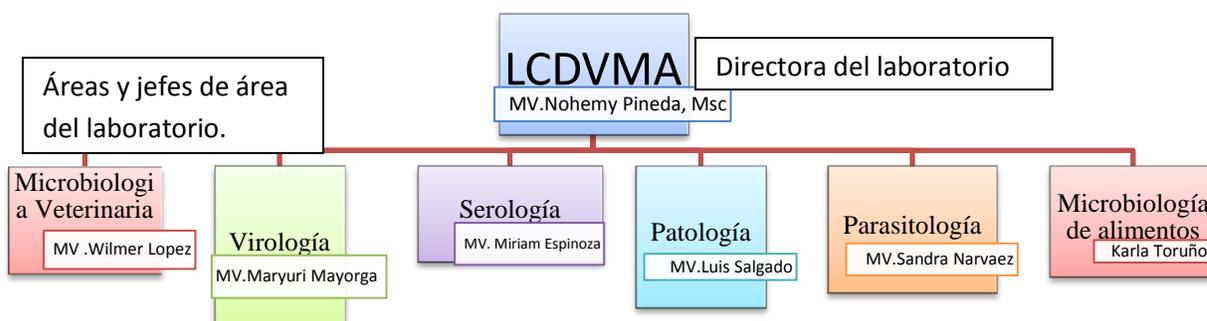
La **Visión** es la de ser un laboratorio líder de referencia nacional e internacional en el ámbito del diagnóstico veterinario y microbiológico de alimentos, a fin de la protección de la condición sanitaria del país, brindando servicio de ensayos especializados, oportuno, confiable y de calidad. El libre acceso a nuestros servicios para todos los clientes que lo soliciten, sean estos de interés público o privado. Garantizándoles seguridad y confiabilidad de nuestros resultados, integridad en el trabajo realizado y manejo confidencial de su información.

Para lograr su misión y visión, la **Organización** se obliga a cumplir con los requerimientos que se establecen para los organismos evaluadores de la conformidad (**OEC**), como laboratorio de ensayos analíticos, según la norma internacional **ISO/IEC 17025:2005**.

Cuenta con el personal competente y suficiente para la comprensión del Sistema de Gestión de la Calidad, quienes están familiarizados con los documentos de la calidad y la implementación de estas políticas y los procedimientos de trabajo.

Mantiene libre acceso a servicios para todos los clientes que lo soliciten, sean estos de interés público o privado. Garantizándoles seguridad y confiabilidad de sus resultados, integridad en el trabajo realizado y manejo confidencial de su información.

ORGANIGRAMA DE DIRECCIÓN DEL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO VETERINARIO Y MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS (LCDVMA) IPSA



Servicios del área Microbiología de Alimentos:

- ✓ Identificación y recuento de Coliformes totales y fecales y *Escherichia coli*, en productos alimenticios de consumo humano.
- ✓ Aislamiento e identificación de *Salmonella* en productos alimenticios de consumo humano.
- ✓ Recuento de *Staphylococcus aureus* en productos alimenticios de consumo humano.
- ✓ Detección y recuento de *Listeria monocytogenes* en alimentos de consumo humano.
- ✓ Recuento de microorganismos aerobios mesófilos en alimentos de consumo humano.
- ✓ Recuento de mohos y levaduras en alimentos de consumo humano.
- ✓ Detección de *Escherichia coli* productores de *Toxina Shiga E. Coli O157:H7* (STEC) en productos cárnicos por PCR tiempo real.
- ✓ Identificación y recuento de *Clostridium sulfito* reductor en alimentos de consumo humano.
- ✓ Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* O1, en mariscos.
- ✓ Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus*, en mariscos.
- ✓ Aislamiento e identificación de *Shigella Sp*, en alimentos de consumo humano.
- ✓ Identificación y recuento de *coliformes totales y fecales* y *Escherichia coli*, en aguas.
- ✓ Recuentos de *Bacillus cereus*, en alimentos de consumo humano.
- ✓ Prueba de esterilidad en alimentos enlatados.
- ✓ Control ambiental por exposición de placas.
- ✓ Recuento de Mesófilos aerobios en hisopados de superficies.
- ✓ Recuento de enterobacterias en hisopados de superficies.
- ✓ Recuento de coliformes totales y fecales en hisopados de superficies.
- ✓ Detección y recuento de *Listeria monocytogenes* en hisopados en drenajes.

Servicios del área Microbiología Veterinaria:

- ✓ Prueba inmunoenzimática para la detección de anticuerpos en sueros (Técnicas ELISA).
- ✓ Aislamiento e identificación de *Salmonella* en hisopados cloacales.
- ✓ Cultivo e identificación de hongos.
- ✓ Recuento de mohos y levaduras en alimentos para animales.
- ✓ Determinación de *Pasteurella spp* en sueros y órganos de animales.
- ✓ Aislamiento e identificación de *Campylobacter* en órganos reproductores del ganado.
- ✓ Aislamiento e identificación de *Haemophilus suis* en sueros y órganos de animales.
- ✓ Aislamiento e identificación de *Streptococcus suis* en sueros y órganos de animales.
- ✓ Aislamiento de *Staphylococcus spp* en sueros y órganos de animales.
- ✓ Aislamiento de *Erysipelothrix rhusopathiae* en sueros y órganos de animales.
- ✓ Aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en sueros y órganos de animales.
- ✓ Aislamiento de *Clostridium spp* en sueros y órganos de animales.
- ✓ Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* género en sueros y órganos de animales.
- ✓ Aislamiento de *Pseudomonas spp* en agua, sueros y órganos de animales.
- ✓ Aislamiento e identificación de *Bacillus anthracis* en sangre de la oreja del animal.

Servicios en área Virología:

- ✓ Inhibición de la hemoaglutinación (HI) para la enfermedad de Newcastle, en suero.
- ✓ Aislamiento viral en huevos embrionados para diagnóstico de Newcastle (NC) e influenza Aviar (IA), en órganos macerados.
- ✓ Cultivo Celular.
- ✓ Detección de Antígeno de la Peste Porcina Clásica (PPC) mediante la prueba de ELISA, en órganos macerados y sangre con EDTA.
- ✓ Detección de Anticuerpo de la Peste Porcina Clásica (PPC) mediante la prueba de ELISA, en suero.
- ✓ Detección de Anticuerpo del síndrome Respiratorio Reproductor Porcino (PRRS) mediante la prueba de ELISA, en suero.
- ✓ Detección de Anticuerpo de la enfermedad de Aujeszky (Pseudorrabia) mediante la prueba de ELISA, en suero.
- ✓ Detección de Anticuerpo de Circovirus mediante la prueba de ELISA, en suero.
- ✓ Detección de Anticuerpo de Bronquitis Infecciosa Aviar (BIA) mediante la prueba de ELISA, en suero.
- ✓ Detección de Anticuerpo de Laringotraqueítis (LT) mediante la prueba de ELISA, en suero.

- ✓ Detección de Anticuerpo de Diarrea Viral Bovina (BVD) mediante la prueba de ELISA, en suero.
- ✓ Detección del virus de Peste Porcina Clásica (PPC) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, en órganos y sangre/EDTA.
- ✓ Detección del virus de Peste Porcina Clásica (PPC) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) convencional, en órganos y sangre/EDTA.
- ✓ Detección del virus de Peste Porcina Africana (PPA) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, en órganos y sangre/EDTA.
- ✓ Detección del virus de Peste Porcina Africana (PPA) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) convencional, en órganos y sangre/EDTA.
- ✓ Detección del *Pestivirus* mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) convencional, en órganos y sangre/EDTA.
- ✓ Detección del virus de Necrosis Hematopoyética e Hipodérmica Infecciosa (IHHNV), mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección del virus de *Necrosis Hematopoyética e Hipodérmica Infecciosa* (IHHNV), mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección del virus de la *Mancha Blanca* (WSSV) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección del virus de la *Mancha Blanca* (WSSV) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección de la *Bacteria Hepatopancreatitis Necrotizante* (NHPB) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección de la *Bacteria Hepatopancreatitis Necrotizante* (NHPB) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección del Virus de la *Mionecrosis Infecciosa* (IMNV) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección del Virus de la *Mionecrosis Infecciosa* (IMNV) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección del *Virus del Síndrome de Taura* (TSV) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.

- ✓ Detección del *Virus del Síndrome de Taura* (TSV) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) convencional, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección del *Virus de Cabeza Amarilla / Virus Asociado a las Branquias* (YHV/ GAV) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección del *Virus de Cabeza Amarilla / Virus Asociado a las Branquias* (YHV/ GAV) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) convencional, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección del *Virus Macrobrachium Rosebergii Nodavirus* (MrNV) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.
- ✓ Detección del *Virus Macrobrachium Rosebergii Nodavirus* (MrNV) mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) convencional, en branquias y pleópodos en camarón de cultivo.

Servicios en área Serología:

- ✓ Detección de anticuerpos para Brucelosis Bovina en suero, mediante la prueba de Rosa de Bengala.
- ✓ Detección de anticuerpos para la Brucelosis equina, mediante la prueba de Rosa de Bengala.
- ✓ Detección de anticuerpos para la Brucelosis en suero Porcino, mediante la prueba de Rosa de Bengala.
- ✓ Detección de anticuerpos para la Brucelosis en suero ovino y caprino, mediante la prueba de Rosa de Bengala.
- ✓ Detección de anticuerpos para la Brucelosis Bovina en suero, mediante la Prueba de Rivanol.
- ✓ Detección de anticuerpos para la Brucelosis en sueros equinos y porcinos y ovinos/caprinos, mediante la prueba de Rivanol.
- ✓ Detección de anticuerpos para la Brucelosis Bovina en leche, mediante la prueba de anillo en leche (Ring test).
- ✓ Detección de anticuerpos para la Brucelosis Bovina en suero y leche, mediante la prueba de ELISA indirecta.
- ✓ Detección de anticuerpos para la Brucelosis Bovina en suero y leche, mediante la prueba de ELISA competitiva.
- ✓ Detección de anticuerpos para la Leucosis Bovina en suero, mediante la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDG).
- ✓ Detección de anticuerpos para la Leucosis Bovina en suero, mediante la prueba de ELISA indirecta.

- ✓ Detección de anticuerpos para la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) mediante la prueba de ELISA indirecta.
- ✓ Detección de antígenos para la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) mediante la prueba de ELISA de verificación.
- ✓ Detección de anticuerpos para la Anemia Infecciosa Equina en suero, mediante la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDG) [Prueba de Coggins].
- ✓ Identificación de Influenza Aviar (IA) en suero mediante el método de inmunodifusión en agar gel.

Servicios en Parasitología:

- ✓ Identificación de huevos de parásitos en muestra de heces de animales, por el método Mc Master.
- ✓ Identificación de trematodos por el método de sedimentación (Benedet).
- ✓ Identificación de larvas de parásitos pulmonares por el método de Larvascopía (Baerman).
- ✓ Identificación de *Trichomonas*, por el método directo.
- ✓ Identificación de Hemoparásitos por el método de frotis de capa delgada (GIEMSA).
- ✓ Identificación de ectoparásitos- Ácaros y Garrapatas.
- ✓ Identificación de ectoparásitos en abejas- Varroasis.
- ✓ Identificación de ectoparásitos en abejas- Acariosis.
- ✓ Identificación de Nosemosis en abejas.
- ✓ Identificación de Loque Americana y Loque Europea en abejas.
- ✓ Diagnóstico de microfilarias por el método de Knott.
- ✓ Identificación de parásitos tisulares.
- ✓ Identificación de parásitos adultos.
- ✓ Identificación de depredadores en panales de abejas.
- ✓ Determinación de Hidroximetilfurfural (HMF) en miel.
- ✓ Determinación de Glucosa comercial en miel.
- ✓ Determinación de % de humedad en miel.
- ✓ Determinación de pH en miel.

Servicios de área Patología:

- ✓ Identificación de Encefalopatía Espongiforme Bovina por el método de Hematoxilina & Eosina (HE), para bovinos, ovinos y caprinos.
- ✓ Diagnóstico directo por observación de lesiones macroscópicas y confirmación de patología por el método de Necropsia y otros análisis.
- ✓ Extracción de muestras histológicas, órganos, tejidos, por el método de Necropsia para otros Laboratorios.
- ✓ Verificación para la Encefalopatía Espongiforme Bovina, por el método de la prueba de Inmuno histoquímica, para bovinos, ovinos y caprinos.

El laboratorio tiene un grupo técnico especializado y comprometido con la comunidad; trabajando para establecer un Sistema de Gestión de Calidad que cumpla con los requisitos de la Norma ISO 17025; la gestión de calidad en el laboratorio incluye elementos técnicos, de gestión y de funcionamiento del análisis e interpretación de resultados analíticos.

El sistema de gestión de calidad permite al laboratorio demostrar tanto competencia como capacidad de generar resultados técnicamente válidos y constantes que satisfagan las necesidades de sus clientes. La necesidad de un reconocimiento mutuo de los resultados analíticos para el comercio internacional y la aceptación de estándares internacionales.

Siendo un laboratorio de referencia nacional, implica un control en la realización de análisis, por medio de calibraciones de todos los parámetros y de controles individuales para cada serie de muestras a analizar, en el **área de Virología** sobre la cual estoy redactando este informe está encaminado a conseguir resultados exactos, rápidos, precisos y confiables en el análisis de muestras para el diagnóstico de enfermedades como:

- ✓ Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS)
- ✓ Peste Porcina Clásica (PPC)
- ✓ Circovirus Porcino
- ✓ Enfermedad de Aujeszky
- ✓ Diarrea Viral Bovina (BVDV)
- ✓ Fiebre del Nilo Occidental
- ✓ **La Enfermedad de Newcastle (EN)**
- ✓ Laringotraqueitis Infecciosa Aviar (LTI)
- ✓ Bronquitis Infecciosa Aviar (BIA)
- ✓ Virus de la Enfermedad de la Cabeza Amarilla (YHV)
- ✓ El virus del Síndrome de Taura (TSV)
- ✓ Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética infecciosa (IHHNV)
- ✓ Bacteria de la Necrosis Hepatopancreática (NHPB)
- ✓ Virus Mionecrosis Infecciosa (IMNV)
- ✓ Nodavirus del Penaeus Vannamei (PVNV)
- ✓ Virus Mancha Blanca (WSSV)

Para la realización de dichos análisis el departamento de Virología se dividía en dos niveles. Nivel II donde se procesaba las muestras mediante técnica ELISA anticuerpo y antígeno para las enfermedades rojas en porcinos (PPC, PRRS, Aujeszky) BVDV en bovinos, Fiebre occidental del Nilo en Equinos, y las enfermedades aviares Newcastle, Larigotraqueitis aviar e influenza aviar. Estos resultados eran emitidos por cuatro analistas médicos veterinarios. Contaba con un conjunto de equipos como un lector para placas ELISA, Ph meter, dos incubadoras, un freezer de 2°C+-4°C para mantener las muestra a procesar ese día y los kits ELISA, balanza analítica, un ovos copio para chequeo de embriones para aislamiento viral, una centrifuga, pipetas mono y multi canal, materiales de reposición y cristalería.

En el espacio designado para realizar la técnica PCR convencional y PCR tiempo real Para diagnosticar las enfermedades de camarón se encontraban cuartos exclusivos para extracción de ácidos nucleicos, amplificación de ácidos nucleicos, electroforesis y finalmente para tiempo real. Tres cabinas de bioseguridad equipos de análisis de imagen de Bio-Rad, reactivos en dos freezers 2°C+-4°C, cuatro termocicladores, microondas para preparación de geles agarosa, una micro centrifuga refrigerada a 4°C, centrifuga convencional, vortex, incubadora, microscopio, materiales de reposición, puntas con filtros, pipetas mono canal.

El nivel III contaba con dos cabinas de bioseguridad tipo II (LABCONCO y ESCO) una designada para pesado y macerado de organos trasvase de muestras y apertura de huevos de aislamiento viral, la segunda cabina para elaboración de medios y su respectivo trasvase. Una balanza analítica, microscopio, una centrifuga y vortex, Dos incubadoras y un baño maría. Materiales para macerado de órganos. Dicha área disponía de freezer a -70°C y -18°C +- 20°C-

III. FUNCIONES DEL AREA DE TRABAJO

Para el diagnóstico de una enfermedad, la vigilancia y el comercio es fundamental disponer de resultados de laboratorio válidos. Estos resultados se logran aplicando unas buenas prácticas de Laboratorio, métodos analíticos y una técnica adecuada así como un sistema de gestión de calidad.

A continuación detallo el conocimiento adquirido durante mis pasantías en el área de Virología bajo orientación y supervisión de la doctora Maryuri Mayorga, el cual esencialmente se basa en una inducción de técnicas utilizadas en el análisis de muestras para el diagnóstico de enfermedades ya antes mencionadas, correcto manejo de la muestras, uso de equipos en el área, realización de tareas de limpieza de materiales que se utilizan, manejo de documentación en solicitudes de análisis de muestras y resultados emitidos para mantener la trazabilidad de las mismas. Así como trabajo experimental que se realizó para la implementación de una nueva técnica de diagnóstico de la enfermedad aviar de Newcastle mediante RT-PCR tiempo real.

Durante la primera semana de las pasantías se me asignó al área lavado y esterilización de materiales bajo la supervisión de la encargada del área María Auxiliadora Soto, quien me explicó de forma detallada cómo se trabaja el material contaminado y no contaminado, su lavado, empaque y esterilización de los mismos. Se me facilitó material de lectura y orientó realizar esas tareas para apropiarme de los procedimientos que se realizaban.

Dos meses y tres semanas posteriores se me ubicó en el área de virología como apoyo para diferentes actividades que se realizaban a diario de trabajo tales como: Toma de temperatura de los freezer área de Virología, Calibrado de PH metro cada vez que se utilizaría un medio, Limpieza de freezer, Inducción a manejo de centrifuga refrigerada, Inducción a lector placas ELISA, Inducción análisis Elisa Antígeno y realización del mismo, Inducción a procedimiento de aislamiento viral, Inducción a diagnóstico de Newcastle mediante técnica RT-PCR tiempo real, Inducción a diagnóstico PPC mediante técnica PCR, Trasvasado y rotulado de muestras, Trasvasado en cabina de bioseguridad de hisopados para aislamiento viral, Limpieza de cabina de bioseguridad tipo II, Ordenamiento y cambio de rotulación de gabinetes del área de virología. Almacenamiento de muestras, Descarte de muestras.

Entrega de materiales sucios a el área de lavado, Elaboración de Virkon al 2%, Montaje de muestras para análisis de DVB, Montaje de muestras para análisis de Larigotraqueitis, Prueba de controles para kit de Paratuberculosis, Pesado y macerado de órganos de aves para aislamiento viral, Pesado y macerado de órganos de porcinos para PPC, Recepción de muestras, Trasvase de muestras aves, Trasvase de hisopados para aislamiento viral, Centrifugado de hisopados para aislamiento viral.

Recepción de huevos SPF para aislamiento viral (limpieza, ovos copiar) Limpieza de cajillas de huevos para aislamiento viral, Rayado y rotulado de cajillas de huevos para aislamiento viral. Seguimiento de huevos inoculados para aislamiento viral (toma de temperatura de la incubadora, ovos copiar huevos a diario hasta su apertura), Pesado de agarosa, Llenado de datos y manejo de lector ELISA, Elaboración de gel agarosa al 2 %, Realización de electroforesis para PCR convencional, Reconstitución de vacuna B1 Sota para extracción ARN técnica RT- PCR tiempo real y Reconstitución de vacuna PPC para PAVs.

Entrega de material sucio en el área de lavado, Limpieza del área nivel III de Virología, Rotulado y trasvase de muestras de bovinos para el área de Serología para análisis de BVD, Lavado de cincuenta y ocho mil cuatrocientas sesenta y cuatro puntas (38,464), Colocar en cajas cincuenta y ocho mil cuatrocientas sesenta y cuatro puntas (38,464), Lavado de 1340 placas así como su almacenaje posterior, Tránsito de alcohol para muestras de camarón en tubos, Centrifugado de muestras de aves para tránsito posterior, Extracción para comprobación de PAVs, inducción en extracción de ácidos nucleicos, Amplificación de PAVs inducción. Realización de presentación de enfermedad Paratuberculosis y Toma de lectura de PH meter para solución de análisis.

Tres meses de las pasantías fueron orientados a un trabajo experimental que se delegó la responsabilidad de realizarlo con aves ponedoras de descarte con el objetivo de hacer un aporte en extender el conocimiento de manejo de esta técnica tan innovadora en la Facultad de Ciencia Animal en la Universidad Nacional Agraria, Realizando un conjunto de actividades de carácter teórico – práctico, y la finalidad de implementación de técnica RT-PCR tiempo real para diagnosticar enfermedad Newcastle. Realizando el seguimiento de las aves vacunadas recolectando muestras a partir de hisopados cloacales en aves vacunadas con sepa La Sota en Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario y Microbiología de los Alimentos (LCDVMA) IPSA.

Posteriormente estas muestras fueron utilizadas para extracción y amplificación de ácidos nucleicos, esto lo realizaba todos los días a las 8: 20 am, así como también, vortex a las muestras extraídas, el tránsito en cabina de bioseguridad tipo II, centrifugado en micro centrifuga refrigerada a 4°C, almacenamiento de las mismas a -70°C, elaboré una bitácora de dicho experimento la cual dejé en el nivel II de Virología y presupuesto del costo de los materiales y equipos utilizados, así como también bajo supervisión de la doctora Mayorga la extracción y ampliación de parte de las muestras extraídas.

IV. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DESARROLLADO

El primero comprende un periodo de tiempo de tres meses durante el cual la primera semana fui ubicada en el área de lavado bajo dirección de la señora Maria Auxiliadora Soto. Realizando recepción de materiales sucios de todas las áreas del laboratorio, llevando un control en bitácora, lavado de materiales sucios contaminados y no contaminados (beakers, pipetas serológicas, morteros, brazos, tubos de ensayo, platos Petri, pipetas pasteur, frascos de vidrio, viales, placas para ELISA, puntas, erlenmeyer, probetas, pinzas, tijeras, espátulas, tanto de material plástico como de vidrio), empaquetado con papel Kraft , así como también esterilización de la mismos y posterior entrega en las áreas que hicieron la solicitud de ese lavado.

4.1 Metodología de Lavado y Esterilización de Materiales

Limpiar con acetona y algodón la cristalería rotulada con marcador antes de iniciar el lavado o descontaminado. Cristalería de vidrio puede ser esterilizada en horno a 170 °C por dos horas o en autoclave a 121° C por quince minutos.

Los tapones, puntas o cualquier otro material que no necesita calor seco se esteriliza en autoclave y luego secar en el horno.

Se realiza la recepción de materiales contaminados de lunes a viernes en horario de 08:00 am - 10:00 am. La recepción de material de descarte de muestras se realiza de lunes a miércoles.

Con la prueba de esterilidad para los materiales esterilizados se puede comprobar la eficacia de los procesos de esterilización a autoclaves y hornos mediante una cinta de verificación para autoclaves y hornos colocados a cada material a esterilizar.

Utilizando formulario técnico se inician los procesos de lavado de cristalería, accesorios y material analítico de igual forma se realiza el uso de una bitácora de lavado de cristalería, accesorios y material analítico en el cual se designará un número de lote al materia lavado previamente, lo cual permite realizar los análisis necesarios para asegurar que los procesos descritos sean satisfactorios y trazables según las necesidades de cada área del laboratorio.

Los procedimientos descritos en las instrucciones de trabajo las realiza el auxiliar de laboratorio del área de lavado de cristalería o personal asignado por el coordinador técnico del laboratorio.

Entre los materiales utilizados están:

- ✓ Detergente neutro Decon
- ✓ Agua destilada
- ✓ Hisopos de diferentes tamaños
- ✓ Recipientes para cristalería
- ✓ Lanilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Pizetas plásticas
- ✓ Papel Kraft
- ✓ Papel de aluminio
- ✓ Bolsas plásticas de 50 libras

Equipos

- ✓ Hornos
- ✓ Hornillas
- ✓ Autoclaves

Reactivos

- ✓ Solución de hipoclorito de sodio
- ✓ Alcohol puro comercial y al 70%
- ✓ Azul de Bromotimol

4.2 Lavado de material contaminado

Se coloca la cristalería en recipientes adecuados, introducir al autoclave y se procede a descontaminar haciendo uso de la instrucción, operación y limpieza de autoclave por 30 minutos. Una vez finalizada la descontaminación dejar enfriar la cristalería aproximadamente una hora. Se recogen los residuos sólidos y líquidos en una bolsa plástica. Se enjuagan todos los materiales con agua caliente. En un recipiente que contenga cloro al 70%. Sumergir la cristalería y dejar un tiempo mínimo de 12 horas. Se restriega el material haciendo uso de hisopos, paste verde y jabón neutral las veces que sea necesario.

Enjuagar con agua potable 4-6 enjuagues y luego con agua caliente. En un recipiente adecuado se adiciona agua destilada se sumerge el material con un mínimo de una hora. Se realiza la prueba de Azul de Bromotimol. Se retira y coloca boca abajo o en los escurridores y se deja secar a temperatura ambiente y luego se procede a empacar el material de la siguiente manera:

Haciendo uso de papel Kraft, empacar de forma individual cada material, se coloca el número de lote asignado. Se coloca una cinta indicadora para autoclave. Se procede a esterilizar en autoclave a 121°C por 30 minutos.

En un recipiente adecuado adicionar mezcla sulfocrómica y sumergir las pipetas de 4-8 horas y se procede a lavar.

4.2.1 Puntas y placas

Para el lavado de puntas se dejan en un recipiente con solución de cloro al 1% por espacio de 24 horas. Pasado ese lapso de tiempo se sacan las puntas de la solución de cloro al 1% y en otro recipiente con agua del grifo son colocadas las puntas removiéndolas manualmente repitiendo el procedimiento 5 veces. A continuación estas puntas son colocadas en un recipiente asegurándose que las mismas queden totalmente cubiertas con agua destilada por 24 horas. Finalmente son extraídas del agua destilada y agitadas fuertemente para retirar el exceso de agua y se ponen a secar.

Las placas se dejan en un recipiente con solución de cloro al 1% por espacio de 24 horas. Pasado ese lapso de tiempo se sacan las placas de la solución de cloro al 1% y son enjuagadas 7 veces con agua del grifo. Después de su enjuague se depositan en un recipiente con una mezcla de agua destilada y jabón neutro por 24 horas. Posteriormente son enjuagadas 7 veces con agua del grifo y son depositadas en un recipiente con agua destilada por 24 horas. Finalmente se extraen del agua destilada y son puestas a secar.

4.3 Lavado de Material no Contaminado

Lavar haciendo uso de paste e hisopos con agua y jabón neutral Decon, restregar las veces que sea necesario. Realizar de 4-6 enjuagues con agua potable. Se realiza el último enjuague con agua destilada y realizar prueba de Bromotimol. Se coloca la cristalería boca abajo o en los escurridores hasta que se seque a temperatura ambiente. Se empaca y esteriliza. La prueba de azul de bromotimol se realiza a cada lote del material que se lava. Dicha prueba se realiza para determinar residuos de detergentes en el material lavado.

Durante dos meses y tres semanas, fui ubicada en el área de virología bajo supervisión de la Médico Veterinario Maryuri Mayorga para inducirme a conocimientos de forma concisa y precisa acerca de la metodología de trabajo en el área de Virología, y apropiarme de las técnicas utilizadas en análisis de muestras para el diagnóstico de enfermedades virales en porcinos, aves, bovinos y equinos comprendiendo un sinnúmero de actividades a realizar para desarrollar destrezas y servir como apoyo en dicha área con tanta carga de trabajo.

Estas actividades contemplaron desde la limpieza del área antes de iniciar con el proceso de análisis con alcohol al 70%, chequeo de temperaturas en el área de Freezers e incubadoras dos veces al día, entrega de materiales sucios a el área de lavado, la recepción de las solicitudes de muestras, reflejarlas en las bitácoras correspondientes a tipo de análisis, revisión de la viabilidad de las muestras, rotulado y trasvase, almacenamiento y descarte de las mismas a temperaturas adecuadas. Limpieza de freezer, Manejo de documentación en solicitudes de

análisis de muestras y resultados emitidos para mantener la trazabilidad de las mismas verificando cada uno de los datos reflejados en los resultados antes de pasarlos a firma.

Aprendiendo y realizando manejo adecuado de equipos en el área, esencial para agilizar el trabajo entre estos equipos estaban: Manipulación adecuada de lector de Placas ELISA llenado de datos, calibrado y toma de lectura de medios en PH meter, Cabinas de bioseguridad tipo II desde su limpieza y desinfección hasta correcto trasvase de muestras y medios en ellas, pesado y macerado de órganos de porcinos y aves, apertura de huevos para aislamiento viral, elaboración de glóbulos rojos al 5%, realización de electroforesis para técnica PCR punto final.

Vortex y centrifugado de muestras para aislamiento viral en centrifugas tanto refrigerada a 4°C como las convencionales, realización de todo el proceso para Aislamiento viral desde la recepción de huevos SPF, limpieza, ovos copiado, rayado, rotulado, almacenamiento (posterior a su inoculación por un analista) seguimiento de la viabilidad de los embriones mediante ovos copiado y toma de temperatura de la incubadora dos veces al día, pesado de agarosa, elaboración de agar gel al 2%, monta de muestras para análisis de Laringotraqueitis aviar, Diarrea Viral Bovina.

Inducción a análisis ELISA, PRC convencional para diagnosticar PPC, PCR tiempo real para diagnosticar Newcastle, Aislamiento Viral, prueba de controles para kit de Paratuberculosis, reconstitución de vacunas a ser utilizadas como controles positivos. Lavado de cincuenta y ocho mil cuatrocientas sesenta y cuatro puntas (38,464), Colocar en cajas cincuenta y ocho mil cuatrocientas sesenta y cuatro puntas (38,464), Lavado de 1340 placas así como su almacenaje posterior, Traspase de alcohol para muestras de camarón en tubos, entrega de materiales para recolección de muestras a veterinarios de campo. Ordene y rotule el área del nivel II, Limpieza del nivel III. Rotulado de muestras en el área de Serología. Rotulado de viales para hisopados cloacales, trasvase de hisopados cloacales.

4.4 Limpieza de Cabina de Bioseguridad tipo II

Las cabinas de bioseguridad deben ser sometidas a una limpieza independiente de la limpieza y desinfección que realiza el usuario, dentro de la cual se incluye la rotación de desinfectantes una vez por semana. Se lleva un registro en un cuaderno bitácora que debe permanecer al lado de la cabina y la limpieza la realiza el personal con previa capacitación. Siempre se deben utilizar guantes, mascarillas protectoras y protectores de ojos.

Materiales y Medios a utilizar

- ✓ Papel toalla
- ✓ Hisopos estériles
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Gradillas
- ✓ Tijeras
- ✓ Botellas de 1000 ml
- ✓ Algodón

- ✓ PBS 1X (solución salina isotónica tamponada con fosfato)
- ✓ Tioglicolato medio líquido
- ✓ Sabouraud medio líquido

Soluciones y Medios

- ✓ Virkon al 2%
- ✓ Hipoclorito de sodio al 2%
- ✓ Hidróxido de sodio
- ✓ Alcohol al 70%

4.4.1 Desinfección de las cabinas

Luego de preparar las soluciones a utilizar se deberá liberar la superficie de la cabina para facilitar su desinfección. Se limpia todas las superficies de las cabinas con papel toalla seco para eliminar restos de material biológico o residuos químicos. Se aplica el desinfectante en todas las superficies de la cabina especialmente en las superficies donde se ha trabajado. Se debe dejar actuar el desinfectante durante 15 minutos. Para aplicar el desinfectante en el piso de la cabina es necesario retirar el piso superficial (pana).

Humedecer papel toalla con alcohol al 70 % y retirar los restos de desinfectante procurando que no queden restos de desinfectantes en las paredes o uniones de las mismas.

Encender la luz ultravioleta durante 15 minutos primero sin el piso superficial. Transcurridos los 15 minutos colocar el piso superficial en su lugar y aplicar 15 minutos de luz ultravioleta adicionales. Se anota en la bitácora de limpieza de cada cabina la solución de limpieza utilizada, tiempos de luz ultravioleta, cualquier otro detalle que pueda generar cambios en los resultados de limpieza de las mismas.

4.4.2 Toma de Hisopados

Al terminar los 15 minutos de luz ultravioleta preparar tubos de vidrio con 5 ml PBS y rotular de la siguiente manera:

Identificación de la cabina, La superficie a realizar hisopado (techo, pared frontal, paredes laterales piso superficial y piso), fecha de toma del hisopado y analista que realiza el proceso. En el caso de tubos con tioglicolato y sabouraud indicar con el mismo detalle que se describió con anterioridad para cada tubo de hisopado, colocando siempre un tubo de cada uno para cada hisopado de las superficies e incluir un tubo adicional de cada uno para realizar control de PBS utilizado.

Se coloca 5 hisopos en cada tubo, por lo que se procura pasar los hisopos por todas las superficies indicadas. Una vez pasado el hisopo colocar únicamente el algodón en el PBS utilizando para ello una tijera. Se repite este procedimiento para todas las superficies a evaluar. Cerrar bien los tubos y aplicar 30 segundos de vortex a cada uno y centrifugar 5 min a 12000 rpm. Al finalizar colocar 1.5 ml de sobrenadante de cada uno de los hisopados a cada tubo con

Tioglicolato y Sabouraud rotulados con anterioridad. Se revisa a las 24, 48 horas y 15 días en caso el del sabouraud.

Tres meses de la pasantía me delegaron hacer un trabajo experimental que se realizó con 4 aves utilizando biología molecular en el estudio de ácidos nucleicos para implementación de una nueva técnica de diagnóstico en el área de Virología para la enfermedad aviar de Newcastle mediante PCR tiempo real ; en el cual tenía la responsabilidad de llevar un seguimiento desde la elaboración del cronograma de actividades, vacuna de las aves, recolección de muestras por tres semanas, iniciando el 26 de noviembre del 2015 el experimento y terminando con las extracciones y amplificaciones de los ácidos nucleicos el 10 de febrero del 2016, elaboración de bitácora del experimento, presupuesto de equipos y materiales, hasta su extracción y amplificación de ácidos nucleicos por mi persona (bajo supervisión del jefe de área).

A través de la cadena polimerasa con el objetivo de hacer un aporte en extender el conocimiento de manejo de esta técnica tan innovadora sobre el estudio de ácidos nucleicos en la Facultad de Ciencia Animal en la Universidad Nacional Agraria , Realizando un conjunto de actividades de carácter teórico – práctico, en este caso en un ente estatal Laboratorio Central de Diagnostico Veterinario y Microbiología de Alimentos (LCDVMA) IPSA, a fin de aplicar y complementar los conocimientos en el campo específico de trabajo, colaborar en la solución de problemas y adquirir experiencias laboral.

Con la implementación de la técnica RT-PCR tiempo real mediante un trabajo experimental con aves para diagnosticar enfermedad de Newcastle a través de la cadena polimerasa se podrá realizar un diagnóstico con mayor rapidez, sensibilidad , seguridad y especificidad debido a la relevancia de la enfermedad y el tiempo que toma emitir un resultado mediante aislamiento viral del cual se requiere en muchos casos de múltiples pases, en un país con una economía insipiente, donde ese tiempo tan valioso es traducido en ganancias o pérdidas económicas, somos un país libre con vacunación de dicha enfermedad y por el cual necesitamos mantener dicho estatus a nivel internacional mediante pruebas más sensibles y que vayan acorde con los requisitos estipulados por la OIE

Es por estas razones de peso en que se sustenta la relevancia del experimento, en una necesidad tangible para ser competitivos con el mercado internacional y garantizar la inocuidad de los productos destinados a consumo humano con una mayor rapidez y eficiencia en la emisión de resultados para quienes solicitan este servicio.

4.5 Diagnostico de enfermedad Newcastle en aves inoculadas experimentalmente mediante biología molecular utilizando RT-PCR tiempo real en el LCDVMA

La industria avícola como fuente productora de proteína es una actividad que genera una importante cantidad de recursos líquidos debido a el ciclo corto de explotación, conversión y disposición de productos como huevo y carne que gozan de gran demanda en el mercado Nicaragüense. La relevancia del experimento se sustenta en una necesidad tangible para ser competitivos con el mercado internacional y garantizar la inocuidad de los productos destinados a consumo humano con una mayor rapidez y eficiencia en la emisión de resultados para quienes solicitan este servicio.

4.5.1 Enfermedad de Newcastle

La enfermedad de Newcastle (EN) está causada por el *paramixovirus* aviar de tipo I (APMV-1), que es un serotipo del género *Avulavirus* perteneciente a la subfamilia *Paramyxovirinae*, familia *Paramyxoviridae*. Los *paramixovirus* aislados procedentes de especies aviares se han clasificado mediante pruebas serológicas en nueve serotipos designados desde APMV-1 a APMV-9; el virus de ND (NDV) se ha denominado APMV-1. (OIE 2008)

Desde su reconocimiento en 1926, la EN se considera endémica en muchos países. La vacunación profiláctica se practica en casi todos los países productores de aves de corral a escala comercial. Una de las propiedades más características de las cepas diferentes del NDV es su enorme variación respecto a la patogenicidad para los pollos.

Las cepas del VEN se multiplican bien en huevos embrionados de gallina y debido a esta propiedad y a los altos títulos virales que se alcanzan en ellos, son utilizados para el aislamiento y propagación del mismo. Las cepas virulentas se diseminan rápidamente por el embrión y producen mortalidad en corto tiempo, mientras que las cepas avirulentas no provocan mortalidad y si la producen, ocurre en un lapso mayor de tiempo después de la inoculación. (REDVET 2011)

Las cepas del NDV se agrupan en cinco pato tipos sobre la base de los signos clínicos observados en los pollos infectados.

1. **Velogénico viscerotrópico:** es muy patogénica en la que se observan frecuentemente lesiones intestinales hemorrágicas.
2. **Velogénico neurotrópico:** se presenta con mortalidad elevada, habitualmente seguida de signos respiratorios y nerviosos.
3. **Mesogénico:** se presenta con signos respiratorios y signos nerviosos ocasionales pero baja mortalidad.
4. **Lentogénico o respiratorio:** se presenta con una infección respiratoria leve o subclínica.

5. Entérico asintomático: normalmente consiste en una infección entérica subclínica.

El período de incubación de la enfermedad oscila de 2 a 15 días con un promedio entre 5 a 6 días. Entre los signos clínicos que pueden estar asociados con la enfermedad se encuentran problemas respiratorios, circulatorios, gastrointestinales y nerviosos. El predominio de determinadas manifestaciones clínicas depende de la edad y estado inmune del hospedero así como del tropismo y virulencia de la cepa actuante.

En los animales afectados, se observa generalmente disnea, cianosis de crestas y barbillas, espasmos musculares, pérdida de apetito, indiferencia, sed intensa, debilidad y somnolencia. A nivel del tracto digestivo, se puede observar inflamación del buche, presencia de mucus espumoso y secreción fibrinosa en la faringe y diarrea verde-amarilla.

Los signos nerviosos se expresan por parálisis de alas y patas, tortícolis, ataxia o movimientos circulares y convulsiones. En ponedoras ocurre una drástica disminución de la producción de huevos junto con despigmentación y pérdida de la cáscara y una reducción en la calidad de la albúmina. (REDVET 2011)



Figura 1. Signos neurológicos, tortícolis, torsión lateral de la cabeza y el cuello. Fuente: Atlas of avian disease.

El virus de la enfermedad de Newcastle es un agente patógeno de los humanos. Las infecciones registradas no suponen un riesgo para la vida y la debilidad que causan no dura más de dos o tres días. Los síntomas que con mayor frecuencia se han señalado en las infecciones humanas son la infección ocular, que normalmente consiste en enrojecimiento de uno o de los dos ojos, lagrimeo excesivo, edema en los párpados, conjuntivitis, y hemorragia de la membrana subconjuntival. (OIE 2008)



Figura 2. El virus de Newcastle puede ocasionalmente infectar a humanos causando conjuntivitis. Fuente: Atlas of avian disease.

Aunque se considera que las lesiones de la EN son patognomónicas de la enfermedad. Es conveniente realizar aislamiento viral para su diagnóstico. La serología puede ser usada como herramienta en el diagnóstico sobre todo en países donde no se lleva a cabo la vacunación. El aislamiento viral se puede llevar a cabo a partir de muestras de tejido o de hisopos traqueales y cloacales inoculados en embriones de 8 a 10 días de edad vía cavidad alantoidea. Otros métodos para el diagnóstico son la tinción de inmunofluorescencia de tejidos y la reacción en cadena de la transcriptasa de reversa (RT-PCR) (Virbac al día ,2010).

La introducción de las técnicas moleculares como prueba aceptada para el diagnóstico, identificación y caracterización del VEN por la OIE, ha posibilitado realizar el diagnóstico de una forma rápida, segura, sensible y específica que permita tomar las medidas de control adecuadas para prevenir la posterior diseminación y minimizar las pérdidas ocasionadas por la enfermedad.

OIE elaboró una lista única de enfermedades de declaración obligatoria para animales terrestres y acuáticos a fin de estar en consonancia con la terminología utilizada por el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio al clasificar las enfermedades como riesgos específicos y otorgar a todas las enfermedades que formen parte de la lista el mismo grado de importancia en el comercio internacional. Para el año **2015**, la lista incluye **117** enfermedades animales, infecciones e infestaciones dentro de la cual la Infección por virus de enfermedad de Newcastle pertenece a **Enfermedades e infecciones de las aves**.

4.5.2 Objetivo general de trabajo experimental RT-PCR tiempo real Newcastle

Diagnosticar Enfermedad Newcastle mediante biología molecular utilizando técnica RT-PCR tiempo real a partir de hisopados cloacales en aves en el Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario y Microbiología de Alimentos (LCDVMA) IPSA inoculadas experimentalmente.

4.5.3 Objetivos específicos

- ✓ Vacunar aves para realización de hisopados cloacales de forma experimental con (vacuna contra Newcastle) cepa La sota, para identificar la presencia del antígeno en las muestras.
- ✓ Realizar extracción de ácidos nucleicos a partir de hisopados cloacales procedentes de aves vacunadas de forma experimental (vacuna contra Newcastle) cepa La sota, para identificar la presencia del antígeno en las muestras.
- ✓ Amplificar muestras de resultado de las extracciones de ácidos nucleicos de los hisopados cloacales procedentes de aves vacunadas de forma experimental (vacuna contra Newcastle) cepa La sota.

4.5.4 Diagnóstico de enfermedad de Newcastle en Nicaragua

En su forma severa está reconocida como la principal amenaza para la avicultura mundial, por las considerables pérdidas económicas asociadas tanto a la alta mortalidad, al sacrificio sanitario que se realiza para evitar una mayor diseminación de la enfermedad, así como, por las restricciones en el comercio de aves y productos avícolas desde y hacia la región afectada.

Nicaragua al igual que el resto del istmo Centroamericano es un corredor biológico con una diversidad de aves y especies que podrían ser portadoras de la enfermedad, razón por la cual se realizan muestreos en granjas tecnificadas y semi- tecnificadas, aves de traspatio y humedales así como los casos de denuncias en presencia de signos clínicos.

El diagnóstico de la EN sobre las base de los signos clínicos y alteraciones patológicas sólo es presuntivo por lo que es necesario, para su confirmación, realizar el diagnóstico de laboratorio, que involucra tanto las técnicas convencionales así como técnicas en **biología molecular**.

Por su gravedad forma parte de la lista de enfermedades de notificación obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE 2004).

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa conocidas en inglés por sus siglas PCR, es una metodología rápida, sensible y altamente específica que puede ser utilizada para ratificar un resultado previo obtenido de otra pruebas que se realizan en el Laboratorio Central de Diagnostico Veterinario y Microbiología de Alimentos en la actualidad tales como: ***aislamiento viral, inhibición de la Hemoaglutinación HI.***

4.5.5 En Aislamiento viral

Las muestras son enviadas en TBTB 33T, deben de ser torulas cloacales y traqueales en grupos de 5 por tubo o pequeños trozos de tráquea, intestino, bazo y pulmón en un tubo con medio de transporte. Para aislar el virus de tejidos se prepara una suspensión al 10% en medio de transporte adicionado con antibióticos y se prepara en una cabina de bioseguridad clase II.

Se utilizan huevos embrionados libre de patógenos específicos (SPF) De 9 a 11 días de edad. Dichos huevos se ovos copian, desinfectan y en la cámara de aire se inocula con la mezcla de antibiótico vía saco alantoideo. Los resultados de los aislamientos del virus son reportados a las unidades avícolas y vigilancia epidemiológica. (LCDVMA 2009)

Las cepas del VEN se multiplican bien en huevos embrionados de gallina y debido a esta propiedad y a los altos títulos virales que se alcanzan en ellos, son utilizados para el aislamiento y propagación del mismo. Las cepas virulentas se diseminan rápidamente por el embrión y producen mortalidad en corto tiempo, mientras que las cepas avirulentas no provocan mortalidad y si la producen, ocurre en un lapso mayor de tiempo después de la inoculación. (REDVET 2011)

Cuando las investigaciones de la EN son el resultado de la aparición de enfermedad severa y mortalidad elevada en grupos de aves, es corriente intentar el aislamiento del virus a partir de aves muertas recientemente o aves moribundas que se sacrifican de forma indolora. Las muestras procedentes de aves muertas deberían consistir en frotis oronasaes, tanto como muestras procedentes de tejidos de pulmón, riñones, intestino (incluyendo contenidos), bazo, cerebro, hígado y corazón. Pueden ser recogidos separadamente o en conjunto, aunque, habitualmente, las muestras intestinales se procesan de forma separada de otras muestras. (OIE 2004)

Las muestras procedentes de aves vivas deberían incluir tanto frotis traqueales como cloacales; las últimas deberían estar visiblemente cubiertas de material fecal. Los pájaros pequeños y delicados pueden dañarse por el muestreo pero la recogida de heces frescas puede servir como alternativa adecuada.

En el caso de que sean limitadas las oportunidades de obtener muestras, es importante que se examinen los frotis cloacales (o fecales) y los frotis traqueales (o tejido traqueal) tanto como los órganos o tejidos más afectados o asociados con la enfermedad clínica. Las muestras deberían tomarse en las etapas tempranas de la enfermedad. (OIE 2008)

Se tendrían que colocar las muestras en solución salina isotónica tamponada con fosfato (PBS), pH 7,0– 7,4, que contenga antibióticos. También se han utilizado medios basados en proteína, como infusión de cerebro-corazón (BHI) o caldo de triptosa con tampón Tris (TBTB), lo que puede incrementar la estabilidad del virus, sobre todo durante el transporte.

4.5.6 Diagnostico de enfermedad Newcastle hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación

Los sueros de pollo raramente dan reacciones positivas no específicas en esta prueba y es innecesario cualquier pre tratamiento de los sueros. Los sueros procedentes de especies distintas a las de los pollos a veces pueden causar aglutinación de los eritrocitos (RBC) de pollo, así que esta propiedad debería determinarse primero, y posteriormente extraer mediante adsorción del suero con RBC de pollo.

Esto se realiza adicionando 0,025 ml de RBC de pollo empacados a cada 0,5 ml de antisueros, agitando suavemente y dejándolos durante al menos 30 minutos; a continuación los RBC se precipitan mediante centrifugación a 800 g durante 2–5 minutos y se decantan los sueros adsorbidos. En diferentes laboratorios se practican variaciones de los procedimientos para las pruebas HA y HI. (OIE 2004)

Debería realizarse en cada prueba, de modo apropiado, un control positivo y negativo de los antígenos y de los antisueros.

4.5.7 Hemaglutinación

- 1) Se distribuyen 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de micro titulación de plástico y fondo en V.
- 2) A cada pocillo se adicionan 0,025 ml de la suspensión vírica (p. ej. líquido alantoideo infectivo). Para una determinación precisa del contenido de HA, se debería hacer a partir de una serie de diluciones muy cercanas a una inicial, p. ej. 1/3, 1/5, 1/7, etc.
- 3) A lo largo de toda la placa se practican diluciones al doble de la suspensión vírica en volúmenes de 0,025 ml.
- 4) Posteriormente se adicionan a cada pocillo 0,025 ml de PBS.
- 5) En cada pocillo se dispensan 0,025 ml de RBC de pollo al 1% (v/v).
- 6) La solución se mezcla golpeando suavemente la placa. Se dejan estáticos los RBC durante unos 40 minutos a temperatura ambiente, p. ej. Aproximadamente a 20°C, o durante 60 minutos a 4°C si las temperaturas son altas, considerando que los RBC control deberían sedimentar de una forma distinta.
- 7) La HA se determina inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de una corriente en forma de lágrima de los RBC. Debería leerse la titulación a la dilución más alta a la que se dé una HA completa (sin corriente); esto representa 1 unidad HA (HAU) y puede calcularse de forma precisa a partir del rango inicial de diluciones.

4.5.8 Inhibición de la hemaglutinación

Se aplica a muestras serológicas procedentes de aves conservadas a 4 grados o en congelación (-20 grados). Se utiliza para detectar y cuantificar anticuerpos específicos contra un subtipo de hemaglutinina. Se origina por la capacidad del virus Newcastle de unirse a las proteínas presentes en la membrana del eritrocito por medio de aglutinina, teniendo como resultados la formación de conglomerados de eritrocitos. (LCDVMA 2012)

La inhibición de la hemaglutinación (HI) se lleva a cabo cuando se pone en contacto un virus de la enfermedad de Newcastle con un anticuerpo específico para el subtipo de la hemaglutinina de ese virus en particular, este último se unirá a la proteína viral bloqueando su propiedad hemaglutinante y por lo tanto el virus perderá la capacidad de unirse a eritrocitos.

- 1) Se dispensan 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de micro titulación de plástico y fondo en V.
- 2) Se adicionan 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.
- 3) A lo largo de la placa se realizan diluciones dobles del suero en volúmenes de 0,025 ml.
- 4) A cada pocillo se añaden 4 HAU de virus/antígeno en 0,025 ml y la placa se deja durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente, p. ej. en torno a 20°C, o 60 minutos a 4°C.
- 5) A cada pocillo se añaden 0,025 ml de RBC de pollo al 1% (v/v) y, después de mezclar suavemente, los RBC se dejan estáticos unos 40 minutos a temperatura ambiente, p. ej. en torno a 20°C, o durante unos 60 minutos a 4°C si las temperaturas del ambiente son altas, considerando que los RBC control deberían sedimentar de una forma distinta.
- 6) El título de HI es la dilución mayor de suero que causa la inhibición completa de 4 HAU de antígeno. La aglutinación se valora inclinando las placas. Debería considerarse que muestran inhibición solo aquellos pocillos en los que la corriente de RBC se produce a la misma velocidad que los pocillos control (que contienen 0,025 ml de RBC y 0,05 ml de PBS).
- 7) La validez de los resultados debería evaluarse frente a un suero control negativo, que no debería presentar un título $>1/4$ ($>2^2$ o $>\log_2$ 2 cuando se expresa como el recíproco), y un suero control positivo para el cual el título debería encontrarse entre una de las diluciones del título conocido. El valor de la serología en el diagnóstico está relacionado claramente con el estado inmune esperado de las aves afectadas. Los títulos de HI pueden considerarse positivos si hay inhibición a una dilución del suero de $1/16$ (2^4 o \log_2 4 cuando se expresa como el recíproco) o superior contra 4 HAU de antígeno. Algunos laboratorios prefieren usar 8 HAU en las pruebas de HI. (OIE 2008)

4.5.9 PCR como método de diagnóstico

PCR ha revolucionado nuestro enfoque básico científico y la investigación médica, las pruebas médicas, forense y ambiental. Proporciona una herramienta extremadamente flexible para el investigador científico, y cada laboratorio de investigación de la biología molecular ahora utiliza PCR rutinariamente. También facilita la medición de los niveles de expresión génica mediante PCR en "tiempo real" que monitorea el nivel de producto de amplificación en cada ciclo de la PCR proporcionando información sobre las concentraciones relativas de ADNc molde.

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. La molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena, que el ADN se estructura en una doble hélice.

La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos. En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés.

Durante la síntesis de ADN, el ADN polimerasa selecciona el nucleótido correcto para añadir al cebador y extender la cadena de ADN de acuerdo a las reglas de apareamiento de bases estándar Watson y Crick (A: T y G: C). Dos clases de ADN polimerasa son de uso general de acuerdo con el templado que copian: ADN polimerasas dependientes de ADN; ADN polimerasas dependientes de ARN también llamado transcriptasas inversas. (PCR 2006).

ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila la llamada *Thermus aquaticus*.

En PCR tres etapas distintas se rigen por la temperatura.

Desnaturalización: el ADN de doble hebra se desnaturaliza por plantilla de calentamiento, típicamente a 94 ° C, para separar las hebras sencillas complementarias.

Hibridación: la reacción se enfría rápidamente a una temperatura de hibridación para permitir que los cebadores de oligonucleótidos hibriden con el templado. Las hebras individuales del molde son demasiado largos y complejos para ser capaz de re hibridar durante esta fase de

enfriamiento rápido. Durante esta etapa de hibridación el ADN polimerasa termoestable estará activa hasta cierto punto y comenzará a extender los cebadores tan pronto como se hibridan al templado. Esto puede conducir a problemas de especificidad si la temperatura de hibridación es demasiado baja.

La síntesis de ADN: la reacción se calienta a una temperatura, típicamente 72 ° C durante en la cual es eficiente la síntesis de ADN, por la ADN polimerasa termoestable. En el primer ciclo de PCR cada cadena molde da lugar a una nueva duplex, duplicando el número de copias de la región de destino. Del mismo modo en cada ciclo subsiguiente de desnaturalización, hibridación y extensión, existe una duplicación teórico del número de copias del ADN diana. (PCR 2006).

En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADN_c) proveniente del ARN_m (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT- PCR (*Reverse Transcription-PCR*, por sus siglas en inglés).

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplificaciones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa.

4.5.10 Detección del virus de la enfermedad Newcastle en muestras usando PCR en tiempo real

Durante los últimos años las técnicas de biología molecular han ampliado su espectro de acción en el campo del diagnóstico de enfermedades en aves de producción y de campo.

La técnica de PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa en tiempo real, está basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de ADN o ADN complementario (ADN_c) específicas y así acceder a datos fiables y precisos sobre la expresión genética de las células en estudio. (REDVET 2009).

La principal ventaja de tiempo real RT-PCR es su sensibilidad y reproductibilidad, cuantifica la cantidad inicial del templado (transcripción) mediante el control de la PCR producto de amplificación (amplificación) de acumulación durante cada ciclo de PCR, a diferencia de los métodos convencionales que detectan el extremo final producto. (PCR 2006).

En esta prueba el producto de la PCR se mide al final de cada ciclo. Los datos pueden ser analizados mediante un software informático y el número de copias de ARN_m o la expresión génica relativa entre varias muestras puede calcularse. Una limitación de la PCR en tiempo real es que se debe utilizar ADN como secuencia diana, ya que las ADN polimerasas no pueden

amplificar ARN de una manera similar. Este problema se puede superar mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa para generar ADN_c a partir de una plantilla de ARN. (REDEVET 2009).

La reacción de la transcriptasa inversa RT-PCR se basa en la capacidad de la enzima transcriptasa, una ADN polimerasa dependiente de ARN inversa, para generar una cadena complementaria de ADN (ADN_c de primera hebra) utilizando el ARN_m como templado.

Para obtener estos resultados, este sistema incluye dos componentes: elementos ópticos integrados al termociclador y marcadores fluorescentes que proporcionan información acerca de amplificación a lo largo de los ciclos de la PCR (REDEVET 2009).

El principio básico de tiempo real RT-PCR es muy similar a la RT-PCR convencional: ADN_c se sintetiza a partir de ARN_m utilizando transcriptasa inversa seguida de ADN_c PCR amplificación y amplificación cuantificación. Sin embargo, hay dos diferencias fundamentales:

(1) La acumulación de amplificación se detecta y cuantifica usando un reportero fluorescente y no por gel de electroforesis convencional.

(2) La acumulación de ampliación se mide durante cada ciclo de PCR en contraste con la detección de punto final estándar. Además, en tiempo real RT-PCR se realiza en placas de micro titulación de 96 pocillos y la señal fluorescente (acumulación de amplificación) se detecta y se cuantifica utilizando un termociclador de PCR en tiempo real. (PCR 2009)

Las técnicas que usan **marcadores fluorescentes específicos** emplean sondas de ácidos nucleídos que se unen a amplificaciones específicos (producto de PCR). Los métodos que utilizan sondas fluorescentes tienen la ventaja de ser muy precisos y evitar posibles artefactos o secuencias inespecíficas presentes en el producto de la PCR, por lo que la interpretación de los resultados suele ser más rápida y directa.

Es importante mencionar que la mayoría de estas sondas usan el fenómeno FRET (fluorescent resonance energy transfer) para emitir las señales luminosas que se van a medir en el termociclador a medida que se obtenga el producto de la PCR. Sin embargo, este enfoque necesita de un diseño de secuencias específicas para su uso como sondas y por consiguiente es más laborioso y costoso (REDEVET 2009).

Una reacción a tiempo real de RT-PCR contiene todos los componentes utilizados para la RT-PCR convencional pero además contiene un reportero fluorescente, ya sea en la forma de un colorante de unión a ADN fluorescente o como un cebador de oligonucleótido fluorescente. Debido a que el reportero fluorescente sólo emite fluorescencia cuando se asocia con el amplificación producto, el aumento de la fluorescencia de la señal registrada durante la amplificación es directamente proporcional a la cantidad de producto de amplificación en la reacción (PCR 2009).

Los resultados del PCR en tiempo real se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento

significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o ADN_c en estudio (REDVET 2009).

El tiempo real TaqMan ensayo de RT-PCR fue reportado por primera vez en 1996 en dos artículos publicados por el grupo de investigación de Williams en Genentech en California y se utiliza ampliamente en programas de investigación tanto básica como aplicada.

El ensayo TaqMan combina el hecho de que la ADN polimerasa Taq tiene 5' → 3' exonucleasa y que las sondas de doble etiquetado de oligonucleótidos solamente emiten fluorescencia cuando se escinde / degradado por esta actividad exonucleasa. En una reacción típica TaqMan se incluyen tres oligonucleótidos: un cebador hacia adelante, un cebador inverso y una sonda TaqMan interna no extendida.

La sonda TaqMan es un oligonucleótido estándar que tiene un colorante informador fluorescente unido covalentemente, tales como FAM (6-carboxi fluoresceína) en su extremo 5' y un colorante inhibidor de la fluorescencia, tal como TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) en su extremo 3'. (PCR 2009).

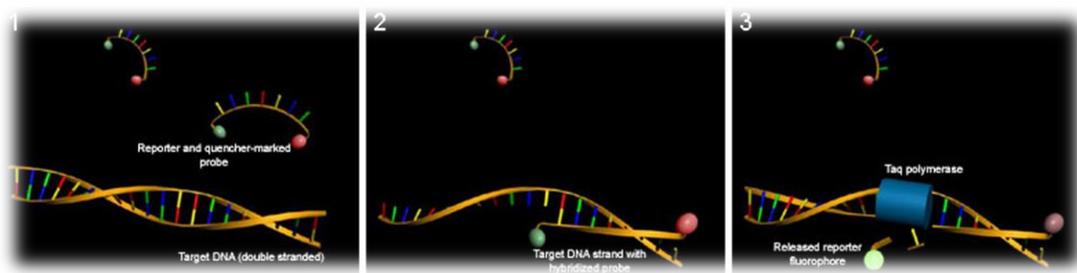


Figura 3. Marcadores fluorescentes

La técnica de reacción en cadena tiempo real de una polimerasa de transcripción inversa (RRT-PCR), fue incorporada y se implementó con la finalidad de asistir en el diagnóstico rápido de la infección del virus de la enfermedad de Newcastle en Nicaragua. Se utiliza un protocolo de un paso con iniciadores específicos designados a amplificar una porción del genoma que contiene unas secuencias objetivo de PCR, sondas específicas **FAM** y **TAMRA** son detectadas monitoreando cambios en la emisión de fluorescencia.

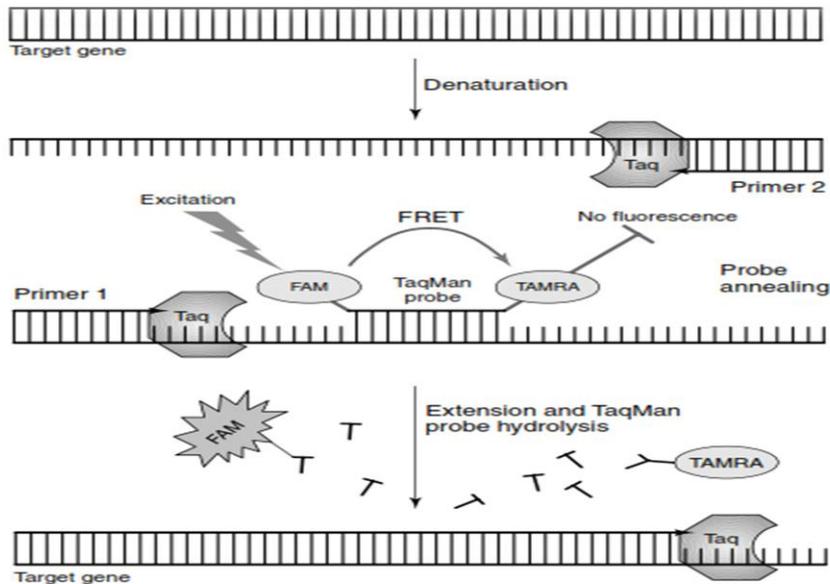


Figure 9.3

A schematic diagram showing the principle of real-time RT-PCR using the TaqMan approach. In addition to general PCR components the reaction also contains a target gene-specific probe containing a fluorescent dye (FAM) at the 5'-end and a quencher dye (TAMRA) at the 3'-end. During the annealing step both the primers and the probe anneal to the target gene and because the quencher dye is in close proximity to the fluorescent reporter dye (on the same oligonucleotide) no fluorescence is generated. During the extension step the 5'→3' exonuclease activity of *Taq* DNA polymerase displaces (degrades) the TaqMan probe resulting in loss of quenching and a fluorescence signal is generated (☀).

Figura 4. Diagrama esquemático en el que se muestra el principio del RT-PCR tiempo real usando TagMan. Fuente: PCR.

La PCR a tiempo real combinada con los nuevos sistemas automáticos para la purificación de ácidos nucleicos, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación y cuantificación de los agentes infecciosos de interés clínico. Debido a sus indudables ventajas, como la facilidad de empleo, la mayor rapidez o el menor riesgo de contaminación, la PCR a tiempo real, irá reemplazando la PCR convencional y se extenderá a un amplio abanico de aplicaciones microbiológicas.

Lo mejor es tratar de evitar la realización de PCR en la misma zona que procesaran las muestras posteriores a la PCR. Gabinetes de PCR pequeños o cámaras con una función de lámparas UV para destruir ADN molde y mantener un ambiente libre de contaminación están disponibles. Siempre use guantes nuevos cuando elabore las reacciones y trabaje sobre superficies limpias lavados regularmente abajo con 1% de hipoclorito de sodio y etanol. (PCR 2006).

Todos los pasos que implica el análisis de las muestras por RT-PCR tiempo real son realizados en espacios diferenciados, con equipamiento y material específico para cada uno:

Área de Preparación de muestras
Área de Extracción de ADN/ ARN
Área de Montaje de mezcla de PCR y Adición de ADN/ ARN molde.

Se trabaja con guantes de nitrilo libre de polvo (talco) y limpio en el área de PCR. Se utilizó una punta con filtro de pipeta diferente cada vez que se pipeteo en el vial conteniendo la muestra. Durante el proceso en que se desarrolla la técnica, se accede a una zona de PCR diferente, desechando los guantes que tenían puestos en el área anterior. El material utilizado es de uso exclusivo para el paso del procedimiento para el que estaba destinado por su situación e identificación.

4.6 Metodología usada en trabajo experimental con aves para implementación de RT-PCR tiempo real para diagnóstico de enfermedad Newcastle LCDVMA.

Se administró vacuna viva a cuatro aves vía conjuntival aplicando una gota a las 8: 30 am del día 26 de noviembre del 2015 de forma experimental. Las cepa de Virus Newcastle, empleada en este estudio es de fabricación veterinaria de virus vivo clasificado en el grupo: Vacunas lento génicas: La Sota Newcastle obtenida de embrión de pollo SPF 1×10^7 DIEP 50. Lote # v-15040. Caducidad: octubre 2016, BIOZOO.



Fotografía 1. Vacuna Newcastle utilizada en el experimento. Fuente Mendoza 2015.

Cada ave fue identificada mediante la utilización de Duraport en una de sus patitas asignándoles los siguientes colores.

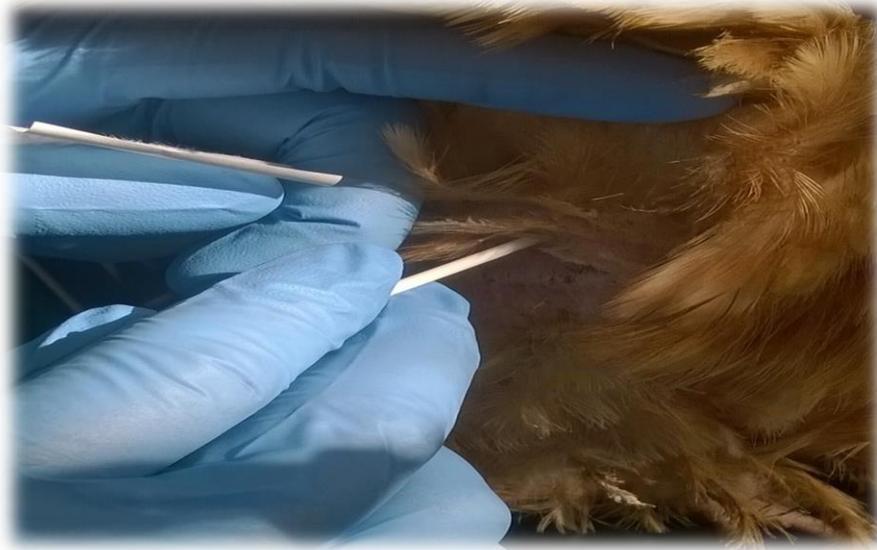
Cuadro1. Identificación de aves vacunadas experimentalmente por números y colores

Número de Ave	Color de Identificación
Gallina 1	Rosa
Gallina 2	Amarillo
Gallina 3	Rojo
Gallina 4	Blanco

Las muestras recolectadas a partir de hisopados cloacales en aves vacunadas de forma experimental en Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario y Microbiología de los Alimentos (LCDVMA) que posteriormente serán utilizadas para extracción y amplificación de ácidos nucleicos con la finalidad de implementación de técnica RT-PCR tiempo real para diagnosticar enfermedad Newcastle. Actualmente Nicaragua es un país libre de enfermedad Newcastle con vacunación.

Se utilizó viales de vidrio de 5 ml, cada uno de ellos rotulado de la siguiente manera: RT-PCR NC, Tesis KM, fecha y número de ave. Cada vial contenía Solución TBTB 33T (penicilina G 18.9 gr, Streptomycin 8.04 gr, Kanamycin 11,000 ul, Nystatin 120 ul , aforados a 50 ml con PBS para aislamiento viral) la cual fue trasvasada a cada uno de ellos en cabina de bioseguridad tipo II ESCO, utilizando para ello pipeta serológica estéril de 10 ml y un llenador de pipetas para extracción y expulsión de la solución en cada uno de los viales.

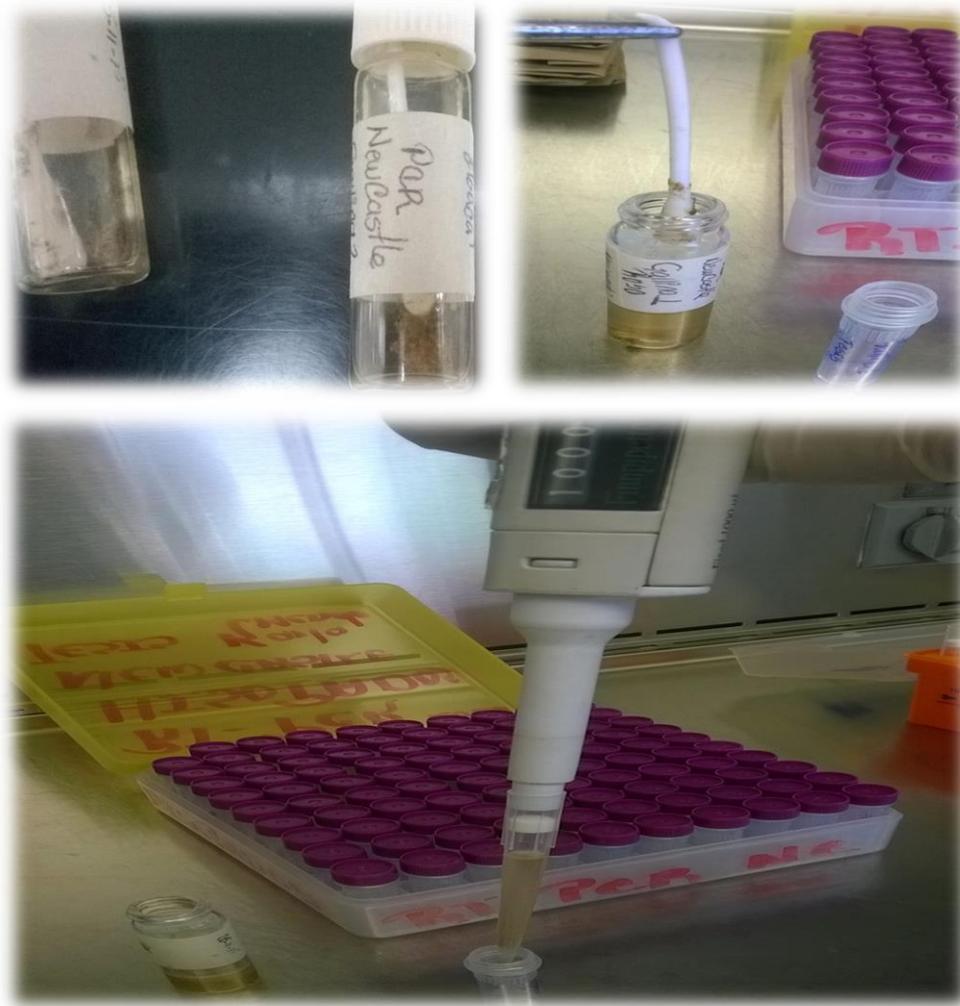
A cada una de las aves debidamente identificadas , se les realizo su respectivo hisopado cloacal, se escogió este tipo de recolección de muestras por las ventajas que ofrece este tipo de método en cuanto a rapidez ya que el virus es eliminado en la heces fecales , utilizando para ello un aplicador estéril con punta de poliéster por cada ave, se usó guantes de látex para evitar contaminación de las muestras y fueron depositados en cada uno de los viales que contenían 3000ul de solución TBTB 33T la cual fue trasvasada a cada uno de los viales en cabina de bioseguridad tipo II ESCO, utilizada exclusivamente para soluciones del área de virología nivel III .



Fotografía 2. Hisopado cloacales en aves vacunadas experimentalmente. Fuente: Mendoza 2015

Las muestras recolectadas de los hisopados cloacales fueron 15 en su totalidad por cada ave vacunada y adicionalmente 4 hisopados en un ave no vacunada a medida de control para descartar posible contaminación vía horizontal en ejemplares aviares que son utilizados como fuente de extracción sanguínea para preparación de glóbulos rojos en técnica HI y aislamiento viral, iniciando el 26 de Noviembre del 2015 y finalizando el 18 de Diciembre 2015 (primer día sin vacunar las aves).

Las muestras obtenidas fueron agitadas por vortex y posteriormente trasvasadas a viales para micro centrifuga de 2 ml, los cuales fueron debidamente rotulados con la siguiente información RT-PCR NC, Tesis KM, fecha, número y color asignado a el ave en cabina de Bioseguridad tipo II LABCONCO, se utilizó una pinza estéril por cada muestra para retirar los hisopos así como puntas de 1000ul con filtro y pipeta de 200-1000ul Finnpipette para extraer las mismas.



Fotografía 3. Traspase de muestras de hispados cloacales. Fuente: Mendoza 2015.

Posteriormente se centrifugaron las respectivas muestras en equipo "Centrifuge 5415R", eppendorf durante 15 minutos a 13000 rpb a 4°C. Las muestras fueron almacenadas a -70°C, para su posterior extracción de ácidos nucleicos.



Fotografía 4. Centrifuga5415R utilizada en área de extracción. Fuente: Mendoza 2015.

La recolección de datos de los hisopados cloacales se plasmó en un cuaderno bitácora ubicado en el nivel II del área de Virología (finalizándola el 18 de diciembre del 2015) y contiene lista de equipos y materiales utilizados. “Implementación de Técnica RT-PCR Tiempo Real para diagnóstico de enfermedad Newcastle 2015”

4.6.1 Extracción de ácidos Nucleicos según protocolo QIAGEN RNeasy utilizado en LCDVMA.

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. La colecta de la muestra y su manejo adecuados son indispensables para una extracción del ADN exitosa. En este caso se utilizó un kit con membrana de sílice (QIAGEN RNeasy).

En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN.

Equipos en Área de Extracción PCR

- ✓ Microcentrifuga 5416 R (eppendorf) Refrigerada 4°C
- ✓ Microcentrifuga 5416 D (eppendorf)
- ✓ Vortex Fisher Scientific

Reactivos Kit de extracción QIAGEN RNeasy

- ✓ 2- Mercaptoetanol (C_2H_6OS)
- ✓ Agua destilada estéril grado biología molecular, Rnase - libre.
- ✓ Etanol 70 %.
- ✓ Kit de extracción QIAGEN RNeasy
- ✓ Buffer RPE
- ✓ Buffer RW1

****2- Mercaptoetanol (C_2H_6OS)** es volátil y tóxico. Soluciones conteniendo (2-ME) siempre deben ser abiertos en una campana de gases y siempre deben usarse guantes.

Materiales para realización de extracción de ácidos nucleicos

- ✓ Pipetas mono canal (P: 200-1000ul ,P:20-200ul, P:10-100ul, P : 5-40ul)
- ✓ Puntas de pipetas con filtro (P- 1000ul, P-200ul, P-20ul)
- ✓ Tubos para micro centrifuga 1.5 ml y 2ml
- ✓ Guantes de Nitrilo

4.6.2 Protocolo Extracción de ácidos nucleicos de Hisopados Cloacales 4 Aves Vacunadas.

1. Agitar en vortex el espécimen del hisopo y transferir 1000ul de la muestra al tubo micro centrifuga rotulado con el número del muestra (RT- PCR, Tesis KM, Fecha..., N° de ave).
2. Centrifugar las muestras en Centrifuga 5415R (Eppendorf) durante 15 minutos a 13000 rpm a 4 °C. (Dejar reposar media hora).
3. Agregar 10 ul de 2-Mercaptoethanol (C₂H₆OS) a 1ml Buffer RLT al tubo micro centrifuga de 2 ml.
4. Centrifugar el lisado por 3 minutos a máxima velocidad. Con cuidado, remover el líquido flotante por pipeteo y utilizarlo posteriormente en el paso 5.
5. Agregar 1 volumen de etanol al 70% al lisado y mezclar bien por pipeteo. NO centrifugar. Proceda de forma inmediata al paso 6.
6. Transferir hasta 700 ul de la muestra, incluyendo cualquier precipitado, a una RNeasy Mini columna de centrifugación colocada en un tubo recolector (suministrado en el kit). Cerrar la tapa y centrifugar durante 15 segundos a 10000 rpm. Descarte el sobrenadante.
7. Agregar 700ul Buffer RW1 a la RNeasy columna de centrifugación. Cierre la tapa y centrifugar durante 15 segundos a 10000 rpm. Descarte el sobrenadante.
8. Agregar 500ul Buffer RPE a la RNeasy columna de centrifugación. Cierre la tapa y centrifugar durante 15 segundos a 10000 rpm. Descartar el sobrenadante.
9. Agregar 500ul Buffer RPE a la RNeasy columna de centrifugación. Cierre la tapa y centrifugar durante 2 minutos a 10000 rpm.
10. Colocar la RNeasy columna de centrifugación en nuevo tubo recolector de 1.5 ml (suministrado en el kit). Agregar 50 ul de agua libre de RNasas directamente a la membrana de la columna de centrifugación. Cierre la tapa y centrifugar durante 1 minuto a 10000 rpm para eluir el RNA. **“El tubo centrifugado ahora contiene el ARN eluido, Se puede utilizar el ARN eluido directamente para RT-PCR o almacenar el ARN eluido a -20°C para un análisis posterior”.**

**Traducido por: Karla Mendoza de Protocolo de Kit QIAGEN RNeasy.

4.6.3 Amplificación de muestras según Protocolo Matriz RT-PCR para APMV en LCDVMA.

Equipos área de Amplificación PCR

- ✓ Cabina de bioseguridad tipo II (The Clone Zone)
- ✓ Mini centrifuga (Mini Spin Plus, eppendorf)
- ✓ Vortex Fisher Scientific

Materiales en área de Amplificación PCR

- ✓ Pipetas mono canal (P: 200-1000ul ,P:20-200ul, P:10-100ul, P:5-40ul , P: 0.5-10ul) Finnpiquette
- ✓ Puntas de pipetas con filtro (P- 1000ul, P-200ul, P-20ul, P-100ul)
- ✓ Tubos para micro centrifuga 1.5 ml y 2ml
- ✓ Guantes de Nitrilo
- ✓ Placa de reaccion óptica de 96 celdas
- ✓ Cubierta óptica adhesiva

4. 6.4 Cálculos de Reactivos para Amplificación Mezcla de PCR-RT Para APMV- MATRIX según protocolo LCDVMA.

Cuadro 2. Mezcla master de PCR-RT para APMV- MATRIX

MEZCLA MASTER DE PCR-RT Para APMV- MATRIX X₁		
dH2O	6.450ul	
5X buffer	5.0ul	Concentración final 1X
25 mM MgCl ₂	1.25ul	3.75 mM
dNTPs (10mM)	0.8ul	320uM
Iniciador-F (20 pmol/ul)	0.5ul	10pmol/25ul
Iniciador-R (20 pmol/ul)	0.5ul	10pmol/25ul
Inhibidor *Rnase	0.5ul	6.67 unidades
Mezcla de Enzimas	1.0ul	
Sonda (6pmol/ul)	0.5-1.0ul	0.24uM
Molde	8.00ul	
Total Mezcla	25ul	

(TVMDL 2005)

APMV- Matriz real-time RT-PCR sonda y frecuencia de iniciador

Cuadro 3. Sondas y frecuencia de iniciador APMV- matriz

Especificación		Secuencia
Matriz	M+4100- iniciador-F	5´ AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC 3´
	M-4220 iniciador-R	5´ CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA 3´
	M+4169 Probe	5´ FAM TTC TCTAGC AGT GGG ACA GCC TGC TAMRA 3´

(TVMDL 2005)

4.6.5 Protocolo de Amplificación en Termociclador AB: Applied Biosystems 7500 Real time Newcastle.

Cuadro 4. Perfil Taqman PCR (APVM)

Perfil Taqman PCR (APVM)				
RT Step	Un ciclo	30 minutos	50°c	
		15 minutos	95°c	
APVM	40 Ciclos	Desnaturalización	10seg	94°c
		Hibridación	30 seg	56°c
		Extensión	10 seg	72°c

(TVMDL 2005)

4. 6.6 Amplificación de extracciones de ARN para diagnóstico de Newcastle

Cuadro 5. Resultados de primera amplificación de gallina 1, 2, 3,4

Mx. Hisopados Gallina 1,2,3,4	Resultados Amplificación de ácidos nucleicos de febrero 2016.
G1 16-12-15	Undt.
G2 16-12-15	Undt.
G3 16-12-15	Undt.
G4 16-12-15	Undt.
G1 18-12-15	Undt.
G2 18-12-15	Undt.
G3 18-12-15	Undt.
G4 18-12-15	Undt.
Órgano ⁺	31.34
Hisopado ⁺	Undt.
C⁺ de Vacuna	16.27
C⁻ H₂O	Undt.
C⁺ Amplificación	17.69
C⁻ Amplificación	Undt.

Cuadro 6. Resultados de segunda amplificación gallina 1,2,3,4

Mx. Hisopados Gallina 1,2,3,4	Resultados Amplificación Ácidos Nucleicos: 10 de febrero 2016.
G1 12-12-15	Undt.
G2 12-12-15	Undt.
G3 12-12-15	Undt.
G4 12-12-15	Undt.
G1 14-12-15	Undt.
G2 14-12-15	Undt.
G3 14-12-15	Undt.
G4 14-12-15	Undt.
Órgano ⁺	31.34
Hisopado ⁺	Undt.
C⁺ de Vacuna	16.27
C⁻ H₂O	Undt.
C⁺ Amplificación	17.69
C⁻ Amplificación	Undt.

C⁺: Control positivo

C⁻: control negativo

Undt: Indeterminado

4.7 Materiales y Equipos Utilizados para implementación de técnica RT-PCR tiempo real para diagnosticar enfermedad Newcastle.

Materiales

- ✓ Aves
- ✓ Solución TBTB 33T (penicilina G 18.9 gr, Streptomycin 8.04 gr, Kanamycin 11,000 ul, Nystatin 120 ul , aforados a 50 ml con PBS para aislamiento viral)
- ✓ Vacuna contra enfermedad NewCastle (La Sota), cada ml contiene virus activo de NewCastle cepa la Sota obtenido de embrión de pollo SPF 1×10^7 DIEP 50. Lote # v-15040. Caducidad: octubre 2016, BIOZOO.
- ✓ Aplicadores estériles con punta poliéster
- ✓ Guantes de nitrilo
- ✓ Guantes de látex
- ✓ Viales de vidrio 5 ml
- ✓ Viales de 2 ml
- ✓ Pipeta mono canal 200-1000ul
- ✓ Pipeta mono canal 20-200ul
- ✓ Pipeta mono canal 10-100ul
- ✓ Pipeta mono canal 5-40ul
- ✓ Pipeta mono canal 0.5-10ul
- ✓ Puntas con filtro de 1000ul
- ✓ Puntas con filtro de 200ul
- ✓ Puntas con filtro de 100ul
- ✓ Puntas con filtro de 20ul
- ✓ Pipeta de 1000ul
- ✓ Pipeta serológica de 10 ml
- ✓ Pipets filler
- ✓ Pinzas estériles
- ✓ Tijera
- ✓ Duraport
- ✓ Maskin tape
- ✓ Bolsas Ziploc
- ✓ Marcadores permanentes
- ✓ Marcador extra fino (rotulado)
- ✓ Cuaderno bitácora
- ✓ Frasco de 1000 ml
- ✓ Papel toalla
- ✓ Espátula

Equipos

- ✓ Cabina de bioseguridad tipo II LABCONCO (trasvase de hisopados)
- ✓ Cabina de bioseguridad tipo II ESCO (trasvase de soluciones)
- ✓ Cabina Mix de bioseguridad tipo II (The Clone Zone)
- ✓ Centrifuga 5415R (EPPENDORF) Refrigerada
- ✓ Centrifuga 5415D (EPPENDORF)
- ✓ AB: Applied Biosystems 7500 Real time PCR System. Termociclador.
- ✓ Digital Vortex Mixer
- ✓ Balanza Analítica (OHAUS)

4.8 Cronograma de actividades de trabajo experimental con aves

Cuadro 7. Cronograma de trabajo RT-PCR Tiempo Real Newcastle Noviembre 2015 –Febrero 2016.

No	1	2	3	4	5	6	7	8									
Actividades	Identificación de aves Hisopados cloacales (antes de vacunar). Vacunación de aves.	Hisopados Cloacales	Trasvase de muestras	Centrifugado de Muestras	Elaboración de Bitácora RT-PCR Newcastle	Extracción de Ácidos Nucleicos	de Amplificación Extracciones	de Evaluación Resultados									
Fecha de inicio	26 de Noviembre del 2015																
Fecha de toma de Hisopados	26-11-15	27-11-15	28-11-15	01-12-15	02-12-15	03-12-15	04-12-15	05-12-15	09-12-15	10-12-15	12-12-15	11-12-15	14-12-15	15-12-15	16-12-15	18-12-15	Se realizó hisopados cloacales a 1 gallina no vacunada
Fecha Hisopados Ave No Vacunada	14-12-15			15-12-15				16-12-15									
Consulta asesores UNA	17-12-15	29-12-15		05-01-16		11-01-16											
Fecha de cumplimiento	10 de Febrero del 2016																
Fecha Extracción	09-02-16 (G1-G4)		10-02-16 (G1- G4)														
Fecha Amplificación	09-02-16 (G1-G4)		10-02-16 (G1- G4)														

* G1: Gallina 1: * G2: Gallina 2: * G3: Gallina 3: * G4: Gallina 4

4.9 Presupuesto

Cuadro 9. Presupuesto de equipos y materiales para diagnóstico de enfermedad Newcastle mediante técnica RT-PCR

Materiales y Equipos	N°	Cantidad	Costo
AB: Applied Biosystems 7500 Real time PCR System. Termociclador.	1	\$6000.00	\$6000.00
Cabina de bioseguridad tipo II LABCONCO (trasvase de hisopados)	1	\$7000.00	\$7000.00
Cabina de bioseguridad tipo II ESCO (trasvase de soluciones)	1	\$7000.00	\$7000.00
Cabina Mix de bioseguridad tipo II (Clone Zone)	1	\$7000.00	\$7000.00
Centrifuga 5415R (EPPENDORF)		\$6725.00	\$6725.00
Centrifuga 5415D (EPPENDORF)		\$2045.00	\$2045.00
Balanza Analítica (OHAUS)		\$2290.00	\$2290.00
Digital Vortex mixer		\$402.99	\$402.99
Freezer (-70° C) ALS Angelatoni Lifescience		\$402.99	\$402.99
Freezer Revco (-20°C)			
Aves		C\$120.00	C\$480.00
Solución TBTB 33T (penicilina G 18.9 gr, Streptomycin 8.04 gr, Kanamycin 11,000 ul, Nystatin 120 ul , aforados a 50 ml con PBS para aislamiento viral)			

Vacuna contra enfermedad NewCastle (La Sota), cada ml contiene virus activo de NewCastle cepa la Sota obtenido de embrión de pollo SPF 1x 10⁷ DIEP 50. Lote # v-15040. Caducidad: octubre 2016, BIOZOO.	1	C\$90.00	C\$90.00
Pipeta mono canal 200-1000ul	1	\$329.00	\$329.00
Pipeta mono canal 20-200ul	1	\$329.00	\$329.00
Pipeta mono canal 10-100ul	1	\$329.00	\$329.00
Pipeta mono canal 5-40ul	1	\$329.00	\$329.00
Pipeta mono canal 0.5-10ul	1	\$329.00	\$329.00
Pipeta serológica de 10 ml + pipets filler	1	\$15.30+24.00	\$39.3
Aplicadores estériles con punta poliéster	69	C\$6.00	C\$414.00
Guantes de nitrilo	200	\$38.65	\$38.65
Guantes de látex	15 p	C\$10.00	C\$150.00
Viales de vidrio 5 ml	10	\$0.30	\$3.00
Viales de 2 ml			
Puntas con filtro de 200ul	2c	\$8.06	\$ 16.12
Puntas con filtro de 100ul	2c	\$8.06	\$ 16.12
Puntas con filtro de 20ul	2c	\$8.06	\$ 16.12
Puntas con filtro de 1000ul	2c	\$7.93	\$ 15.86
Kit QIAGEN	1	\$400.00	\$400.00

Pinzas estériles	5	C\$75.00	C\$375.00
Duraport	1	C\$40.00	C\$40.00
1-Maskin tape	1	C\$20.00	C\$20.00
Bolsas Ziploc	5	C\$15	C\$75
Marcadores permanentes	3	C\$15.00	C\$45.00
Marcador extra fino	1	\$1.25	\$1.25
Cuaderno bitácora	1	C\$20.00	C\$20.00
Espátula	1	\$13.41	\$13.41
Placa de reacción óptica de 96 celdas + Cubiertas de placas	2	\$15.00	\$30.00
TOTAL			\$ 41162.81

Fisher Scientific Catalogo 2011-2012

V. RESULTADOS OBTENIDOS

Desarrollo de destrezas en el área de virología sobre las cuales estaban orientadas las actividades que me fueron asignadas y me permitió el aprendizaje integral de:

1. Calibrado de PH metro.
2. Toma de lectura de PH meter para solución de análisis.
3. Manejo de centrifuga refrigerada
4. Llenado de datos y manejo de lector ELISA.
5. Conocimiento análisis Elisa Antígeno
6. Manejo del procedimiento de aislamiento viral.
7. Manejo de procedimiento Newcastle mediante técnica RT-PCR tiempo real.
8. Manejo de diagnóstico PPC mediante técnica PCR.
9. Trasvasado y rotulado de muestras.
10. Trasvasado en cabina de bioseguridad de hisopados para aislamiento viral.
11. Limpieza de cabina de bioseguridad tipo II.
12. Almacenamiento de muestras.
13. Descarte de muestras.
14. Elaboración de Virkon al 2%.
15. Montaje de muestras para análisis de ELISA.
16. Prueba de controles para kit de Paratuberculosis.
17. Pesado y macerado de órganos.
18. Recepción de muestras.
19. Tránsito de muestras aves.
20. Tránsito de hisopados para aislamiento viral.
21. Centrifugado de hisopados para aislamiento viral.
22. Correcto manejo de huevos SPF para aislamiento viral (limpieza, ovos copiar)
23. Rayado y rotulado de cajillas de huevos para aislamiento viral.
24. Seguimiento de huevos inoculados para aislamiento viral (toma de temperatura de la incubadora, ovoscopiar huevos a diario hasta su apertura).
25. Pesado de agarosa.
26. Elaboración de gel agarosa al 2 %.
27. Realización de electroforesis.
28. Reconstitución de vacuna B1 Sota para extracción ARN técnica RT-PCR tiempo real.
29. Reconstitución de vacuna PPC para PAVs.
30. Tomar temperatura de freezers.
31. Rotulado y tránsito de muestras de bovinos para el área de Serología para análisis de BVD.
32. Lavado puntas y esterilización utilizadas para montar muestras
33. Lavado placas utilizadas en análisis ELISA

Manejo de equipos necesario en la realización de dichos análisis. Micro centrifuga refrigerada, vortex, Balanza analítica, Cabinas de bioseguridad tipo II ESCO Y LABCONCO, lector de ELISA, PH meter, incubadoras y termociclador.

Capacidad de desarrollar un proyecto desde su planificación, organización, darle un seguimiento y llevarlo a término.

La realización de estas pasantías me permitió formarme un amplio criterio sobre la relevancia en el diagnóstico de enfermedades que se realizan en el área y de cuál es su verdadero impacto en la economía del país y la salud pública.

La responsabilidad que conlleva hacer este trabajo en base a conocimiento, orden, seguimiento de protocolos, de la preparación a conciencia de los analistas que realizan este trabajo, que respalden un resultado que se entrega tomando en cuenta que cada uno ellos va respaldado por la credibilidad del laboratorio.

Confianza en aceptar nuevos retos y apropiarme del conocimiento de una herramienta tecnológica como es el RT-PCR tiempo real, que se ha desarrollado para ofrecer una alternativa para el estudio de ácidos nucleicos.

VI. LECCIONES APRENDIDAS

- ✓ Nuevo aprendizaje que me permite tener una formación más integral y ser más competitivo en el campo laboral no solo por la experiencia en el área de virología sino por las relaciones interpersonales entre compañeros de trabajo y respeto de jerarquías.
- ✓ **Respeto** que cualquier empleado debe de sentir por su jefe en base a la jerarquía que rige la empresa sin embargo, sin perder de vista que dicho respeto **es bidireccional**.
- ✓ En un ambiente laboral a diario se presentarán situaciones que pondrán a prueba el carácter y la capacidad de resolver retos. Pensar rápido bajo presión y buscar soluciones.
- ✓ Adaptarme a la cultura de una empresa, me refiero al respeto de la confidencialidad de los resultados que se emiten a los usuarios que solicitan los servicios y evitar relaciones interpersonales con los mismos. Cabe mencionar que esto no quiere decir traicionar mis principios.
- ✓ Ni un sueldo, ni una cantidad inmensurables de beneficios justifica estar en un trabajo si pierdes tus valores y principios. Es básico tener presente esto en todo momento sobre todo porque me di cuenta que en cada resultado emitido conlleva una repercusión directa en la salud de las personas, es una gran responsabilidad y hay que ser consciente de eso, exige preparación.
- ✓ Utilizar buenos modales, hábitos que deben acompañar siempre, especialmente en el ámbito laboral. Nadie quiere trabajar con personas soberbias o poco agradecidas, con un “por favor” o “gracias” cada vez que fue necesario. Este punto fue muy vital porque te permite desarrollarte de tal manera que no se vea retrasado el proceso por falta de comunicación entre el equipo de trabajo.
- ✓ Tener claro cuáles eran mis responsabilidades como pasante y el trabajo que me fue asignado llevarlo a término.
- ✓ En un área de trabajo cada miembro del equipo debe estar comprometido con lo que se está haciendo en conjunto. El liderazgo no es de uno solo, el liderazgo es compartido.

- ✓ Tome en cuenta aquellas críticas que considere oportunas, dejando de lado todas aquellas que no me aportaban nada. Crecimiento como ser humano y formación de carácter.

- ✓ Atención a cada detalle de las funciones que realice y soportar todo por escrito, tengo la certeza que esto fue lo más valioso que aprendí en un ambiente laboral, una gran herramienta para la vida.

VII. CONCLUSIONES

La realización de pasantías deberían tener siempre un componente formativo, ya que de eso se trata: de formación en el trabajo. Si se utilizan los jóvenes estudiantes para llevar a cabo tareas que normalmente son realizadas por el personal estable de dicha institución, una pasantía debe dar la oportunidad a los jóvenes de aprender calificaciones prácticas que causarán una buena impresión sobre los potenciales empleadores. También debería ayudarlos a establecer contactos y quizás a conseguir un trabajo. Contactos que me dieron la oportunidad de que me llamaran de IPSA (DIA) para una capacitación de Inocuidad la carne por dos semanas cuya experiencia en la misma también anexare a mi hoja de vida, abrió un abanico de posibilidades.

La pasantía me permitió la oportunidad de aplicar los conocimientos adquiridos en la Universidad Nacional Agraria, intercambiando información científica e investigación sobre temas innovadores como el de biología molecular en el estudio de ácidos nucleicos. Realicé un conjunto de actividades de carácter teórico – práctico, en este caso en un ente estatal Laboratorio Central de Diagnostico Veterinario y Microbiología de Alimentos (LCDVMA) IPSA, a fin de aplicar y complementar los conocimientos en el campo específico de trabajo, colaborar en la solución de problemas y adquirir experiencias laboral.

La industria avícola siempre se ha caracterizado por ser pionera en el desarrollo y utilización de tecnología de punta en sus procesos productivos, siendo esto la consecuencia natural de las exigencias propias de la dinámica de un negocio, en el que los cerrados márgenes de ganancia exigen de las aves, el productor y los técnicos la mayor eficacia.

Para el diagnóstico, la vigilancia y el comercio *es fundamental disponer de resultados de laboratorio válidos:*

Espero que esta tecnología de biología molecular a mediano plazo se implemente en el laboratorio de la Universidad Nacional Agraria y permita a sus alumnos tener una formación integral para ser más competitivos en el ámbito laboral. Difundiendo los fundamentos de PCR como un paso para conocer varias herramientas tecnológicas para el estudio de ácidos nucleicos.

VIII. RECOMENDACIONES

La complementación de la formación que brindan las instituciones educativas con el ejercicio propio de la profesión elegida a través de las pasantías, los estudiantes puede aplicar los conocimientos teóricos y adquieren experiencia en ámbitos relacionados con sus futuros campos de trabajo. La Universidad Nacional Agraria prepara a los estudiantes para cubrir un perfil específico dentro del mercado laboral, el objetivo de la pasantía es múltiple ya que debe posibilitar que el alumno descubra o comience a conocer cuál es el campo específico de su formación que más le interesa, que al insertarse laboralmente pueda desempeñar eficazmente las tareas que se le asignan, que se facilite la etapa de transición de lo educacional a lo laboral, contribuyendo a una correcta elección del área de trabajo por parte del estudiante.

El valor de la pasantía para el estudiante equivale a la posibilidad de satisfacer las necesidades de desarrollo que se expresan en trabajo profesional, especialmente cuando se toma en cuenta que el sistema universitario produce personas que aun siendo graduadas apenas han comenzado su proceso formativo. Se hace indispensable continuar con esta metodología de formación integral que abre oportunidades a jóvenes profesionales.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

- Angulo, Enrique.2010. Enfermedad de Newcastle Aviar. Virbac al día. no.12: 1-8.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR).1999. Redacción de Referencias Bibliográficas Normas Técnicas del IICA y el CATIE. 4. ed. Turrialba, C.R. Biblioteca Conmemorativa Orton.p.1-38.
- Cornell University College of Veterinary Medicine. Atlas of Avian Diseases. p.12,16,18,22,27,32,34.
- Cuello, Sandra; Vega, Armando; Noda Julia. 2011. Actualización sobre la Enfermedad Newcastle. REDVET (Revista Electrónica de Veterinaria). 12(6): 1-30.
- Fisher Scientific Catalogo 2011-2012
- Mc Pherson, Michael; Geir Moller, Simon. 2006. PCR. Owen, Elizabeth. 2 ed. Cornwall, UK. MPG BOOKS Limited. p. (2-6,9-11,23,35,37,51,52,53,65,67,78,81,113,114,186,209-211,214-216). ISBN 0-203-00267-9.
- LCDVMA (Laboratorio Central de Diagnostico Veterinario y Microbiología de Alimentos). 2012. Diagnóstico Newcastle por la Técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación. p.1-9.
- LCDVMA (Laboratorio Central de Diagnostico Veterinario y Microbiología de Alimentos). Pineda, Nohemy. 2009. Aislamiento para Newcastle e Influenza Aviar o Propagación Viral en Huevos Embrionados. p. 4-6.
- Leon Rodríguez, Bernal; Vargas Brenes Olga Marta; Guevara Soto Maricruz; Solano Pereira Max. 2009. Analisis Molecular de una Cepa de Virus de Origen Vacunal Aislada a partir de un Hisopado Cloacal de Aves Sanas en Costa Rica. REDVET (Revista Electrónica de Veterinaria). 10(11): 1-19.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). FR.2004. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para los Animales Terrestres (mamíferos, aves y abejas) 1.ed. Paris, FR.1v.p.33, 34, 38,293-299,301.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). FR.2008.Manual de la OIE sobre animales terrestres 1.ed. Paris, FR.1v.p.2, 3, 7,8.
- Protocolo de Kit QIAGEN RNeasy.
- Rodríguez G, Mabel; Rodríguez William. 2006. PCR en Tiempo Real. p.6

TVMDL (Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory- College Station Molecular Genetics - SOP). 2005. Detección Del Virus de la Enfermedad Newcastle Exótica en Muestras Clínicas Usando PCR en Tiempo Real. p.1-7

UNA (Universidad Nacional Agraria) .2008.Guías y Normas Metodológicas de las Formas de Culminación de Estudios.p.11-24, 36-56.

Vinueza Burgos, Christian. 2009. PCR en Tiempo Real: La nueva era de la Información Genética Celular. REDVET (Revista Electrónica de Veterinaria). 10(2): 1-13.

X. ANEXO

Anexo 1. Edema severo en cabeza y en ojo conjuntivitis severa con edema de córnea
Fuente: Atlas of avian disease.



Anexo 2. Diarrea característica de Newcastle, pigmento biliar verde y uratos blancos. Fuente: Atlas of avian disease.



Anexo 3. Baja calidad, cascara blanda, rugosa o deformación de los huevos. Fuente: Atlas of avian disease.



Anexo 4. Edema peri orbital que produce forma facial cuadrada. Fuente: Atlas of avian disease.



Anexo 5. Cabina de bioseguridad tipo II Esco (trasvase de solución TBTB 33T) Fuente Mendoza 2015.



Anexo 6. Balanza analítica. Fuente Mendoza 2015.



Anexo 7. Centrifuga 5415R, 5415D (Eppendorf). Fuente Mendoza 2015.



Anexo 8. Cabina de bioseguridad tipo II (The Clone Zone). Fuente Mendoza 2015.



Anexo 9. Equipo Applied Biosystems 7500. Fuente Mendoza 2015.



VIVIENDO MI PASION: MEDICINA VETERINARIA

