

Universidad Autónoma del Estado de México
Centro Universitario UAEM Amecameca
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia



Manual de Prácticas *Virología*

Elaboró: Dra. Virginia Guadalupe García Rubio
Dra. María del Rosario Santiago Rodríguez

Fecha: Julio/2020

Fecha de
aprobación

H. Consejo Académico

25/09/2020

H. Consejo de Gobierno

30/09/2020



ÍNDICE

I. Datos de identificación	3
II. Presentación	4
III. Lineamientos de Laboratorios	4
IV. Normas de seguridad para trabajar en el Laboratorio	5
V. Sistema de Evaluación	5
VI. Organización y desarrollo de las prácticas	
Práctica 1	6
Bioseguridad, material, equipo y desinfección	
Práctica 2	24
Diluciones más utilizadas en Virología	
Práctica 3	29
Hemoaglutinación viral	
Práctica 4	36
Inoculación de diferentes virus en el embrión de pollo	
Práctica 5	47
Detección de lesiones en el embrión de pollo y cosecha de virus	
Práctica 6	54
Técnicas de PCR y RT-PCR	
VII. Referencias Bibliográficas	60



I. Datos de Identificación

Espacio educativo donde se imparte

Centro Universitario UAEM Amecameca

Licenciatura

Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Unidad de Aprendizaje

Virología

Clave

L43731

Carga académica

4

Horas teóricas

2

Horas prácticas

6

Total de horas

10

Créditos

Periodo escolar en que se ubica

1

2

3

4

5

6

7

8

9

Seriación

Microbiología

UA Antecedente

Ninguna

UA Consecuente

Tipo de Unidad de Aprendizaje

Curso

Curso-Taller

X

Seminario

Taller

Laboratorio

Práctica Profesional

Laboratorio

Práctica Profesional

Otro tipo (especificar)

Modalidad educativa

Escolarizada. Sistema rígido

No escolarizada. Sistema virtual

Escolarizada. Sistema flexible

X

No escolarizada. Sistema a distancia

No escolarizada. Sistema abierto

Mixta (especificar)

Formación común

Formación equivalente



II. Presentación

El programa de prácticas de la Unidad de aprendizaje virología, está diseñado considerando la estructura de la unidad de aprendizaje. La virología veterinaria comprende una gran cantidad de técnicas de laboratorio de las diferentes viriosis que afectan a los animales domésticos, así, las prácticas constituyen las actividades que permiten al alumno desarrollar habilidades psicomotrices que vinculan a la virología con el entorno del Médico Veterinario Zootecnista ya que no es posible establecer diagnósticos virales precisos, sin la confirmación que brinda el laboratorio. El objetivo del presente manual es que el alumno sea capaz de integrar los conocimientos teóricos sobre la importancia de la bioseguridad, patogenicidad viral y técnicas de diagnóstico incorporando además técnicas moleculares que permiten detectar agentes virales de forma rápida y precisa. El presente manual constituye una guía facilitadora tanto para el estudiante como para el docente en la realización de las prácticas en el laboratorio.

III. Lineamientos del laboratorio.

Las prácticas se realizarán en el Laboratorio multidisciplinario del CU Amecameca UAEM. Cada práctica tiene una duración de dos horas. Se requiere puntualidad, se dará tolerancia de 15 minutos y no podrán entrar al final de este tiempo establecido, tampoco se permitirá la salida de alumnos durante las prácticas. Los alumnos se integrarán en equipos conformados por 4 a 6 alumnos, portarán bata limpia, cubrebocas, cofia (cabello recogido), de ser necesario portar guantes y googles cuando se requiera. Queda prohibido ingerir líquidos y alimentos, así como mascar chicle. Se conducirán con respeto y en silencio, siguiendo las indicaciones durante el desarrollo de la práctica por parte del profesor.

Al concluir la práctica los alumnos deberán limpiar y en su caso desinfectar el área de trabajo y entregar al responsable del laboratorio el material solicitado o en su caso dejar los instrumentos y reactivos limpios y ordenados. En caso de generar material biológico infeccioso se observarán las indicaciones de inactivación y se colocarán en contenedores para su esterilización y eliminación apropiadas. Para realizar las prácticas se procederá mediante solicitud de acuerdo a los lineamientos del laboratorio. Retirar la bata una vez fuera del laboratorio.

De acuerdo a los lineamientos establecidos por el responsable del laboratorio, un comportamiento irresponsable o la violación de los lineamientos expuestos será motivo de suspensión temporal o definitiva de las prácticas de laboratorio y de sanción académica.



IV. Normas de seguridad para trabajar en el Laboratorio

PARA EL PERSONAL

Lavado de manos de manera minuciosa antes y después de la práctica

Nunca inhalar, probar u oler directamente productos químicos, sobre todo si se desconocen sus características.

Para pipetear se deben usar perillas de seguridad o propipetas

Es necesario identificar y localizar los dispositivos de seguridad (extintores, lavaojos, salidas de emergencia).

Para evitar accidentes es fundamental trabajar con orden y limpieza, por ello las áreas de trabajo deben permanecer limpias y únicamente con el material que la práctica requiere

Mantener los pasillos despejados.

DE LA PRÁCTICA

Antes de entrar a laboratorio es necesario conocer el trabajo a realizar en cada sesión

Leer las etiquetas de seguridad de los reactivos

En caso de accidente o derrame de algún reactivo, reportarlo al docente y al responsable del laboratorio

Evitar el uso de equipos o aparatos sin conocer su funcionamiento, en caso de duda siempre es mejor preguntar al docente o al responsable del laboratorio.

Para el deshecho de residuos, se deberán seguir las instrucciones del responsable del laboratorio, ya que por disposición oficial (art.151 L.G.E.E.P.A.) está prohibido desechar soluciones contaminantes o reactivos en la tarja o botes de basura.

V. Sistema de Evaluación

La calificación de la parte práctica de la unidad de aprendizaje corresponde al 30% de la evaluación total del curso, de este porcentaje:	
Lectura previa del protocolo	10%
Desarrollo de la práctica	10%
Reporte de prácticas	10%
Total	30%



VI. Organización y desarrollo de las prácticas

Práctica 1

Bioseguridad, Material, Equipo y Desinfección.

Introducción

El fundamento en la práctica de la bioseguridad es la evaluación de riesgos, en este sentido el juicio profesional juega un papel determinante. La bioseguridad se define como el conjunto de lineamientos, medidas y acciones de prevención, control, mitigación y erradicación de impactos y repercusiones adversas a la salud y el ambiente con la finalidad de proteger de agentes potencialmente nocivos la salud humana y animal, así como al medio ambiente. La bioseguridad constituye una metodología que permite desarrollar actitudes y conductas que disminuyan el riesgo de adquirir infecciones en el laboratorio. La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 1983 la primera edición del manual de Bioseguridad en el laboratorio, en donde se plasman lineamientos y normas generales, dicho manual ha sido actualizado de manera constante, sin embargo, se ha solicitado que cada país desarrolle sus propios códigos de seguridad. El tema de bioseguridad en el laboratorio es extenso y comprende varios aspectos: Niveles de seguridad, Clasificación de agentes por grupo de riesgo, equipo de protección personal (barrera primaria), instalaciones (barrera secundaria), capacitación del personal, manejo de residuos peligrosos y sustancias químicas, señalización y código de colores, desinfección, esterilización y planes de contingencia. En cuestión de bioseguridad es importante conocer la clasificación de microorganismos infecciosos, en este manual, solo se mencionará la parte correspondiente a los virus.

Clasificación de los microorganismos infecciosos (virus) por grupos de riesgo. OMS

Grupo de riesgo 1. Riesgo individual y poblacional escaso o nulo. Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales (Tabla1).

Grupo de riesgo 2. Riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente.

La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado: Familia



Adenoviridae: Adenovirus, todos los serotipos. *Arenaviridae*: virus de la coriomeningitis grupo de la encefalitis de California, género *Phlebovirus* todas las especies excepto el virus de la fiebre del valle de Rift.

Familia *Caliciviridae*: todos los aislados incluyendo Hepatitis E y Norwalk (Tabla1).

Familia *Coronaviridae*: coronavirus humanos (todas las líneas); encefalomiелitis transmisible del cerdo; encefalomiелitis hemoaglutinante del cerdo; coronavirus bovino; virus de la peritonitis infecciosa felina; virus de la bronquitis infecciosa aviar; coronavirus caninos, de ratas y conejos. Familia *Flaviviridae*: virus de la fiebre amarilla, virus del Dengue (serotipos 1,2,3,4), Kunjin. Familia *Hepadnaviridae*: virus de Hepatitis B. Familia *Herpesviridae*: Subfamilia *Alphaherpesvirinae*: género *Simplexvirus*: (todos los aislados incluyendo HHV1 y HHV2, *Herpesvirus B* que se incluyen en el grupo de riesgo 3), género *Varicellovirus*: (todos los aislados incluso varicella/zoster (HHV3) y virus de la pseudorrabia. Subfamilia *Betaherpesvirinae*: género *Cytomegalovirus*: (todos los aislados incluyendo CMV -HHV5); género *Muromegalovirus*: todos los aislados. Subfamilia *Gammaherpesvirinae*: género *Lymphocryptovirus*, virus de Epstein Barr (HHV4) yaislados similares a EB; género *Rhadinovirus*, Familia *Orthomyxoviridae*: género *Influenzavirus*: Influenza virus tipo A, Influenza virus tipo B, Influenza virus tipo C (todos los aislados). Familia *Picornaviridae*: género *Aphthovirus*; género *Cardiovirus* (todos los aislados). Familia *Poxviridae*: poxvirus de vertebrados, género *Capripoxvirus*, género *Molluscipoxvirus*; género *Yatapoxvirus* género *Avipoxvirus*, género *Leporipoxvirus*, Subfamilia *Orthopoxvirinae*: género *Parapoxvirus* (todos los aislados), género *Suipoxvirus*, Swinepox. Familia *Reoviridae* género *Orbivirus* (todos los aislados), género *Orthoreovirus* tipos 1, 2 y 3.; género *Rotavirus* (todos los aislados).

Familia *Retroviridae*: Subfamilia *Lentivirinae*: (todos los aislados excepto HIVI, HIV-II). Familia *Rhabdoviridae* género *Vesiculovirus* (todas las líneas adaptadas en laboratorio); género *Lyssavirus*: virus de la rabia. Familia *Togaviridae*: género *Alphavirus*, Semliki forest virus Sindbis O'Nyong-Nyong Ross river virus; virus de la encefalitis equina de Venezuela (Solo líneaTC-83) género *Rubivirus*, Rubella virus; género *Pestivirus*: virus de la Hepatitis C; virus de la diarrea viral bovina; virus de Border disease; género *Arterivirus*: virus de la arteritis equina, virus sin clasificar. Familia *Toroviridae*. Otros virus de la Hepatitis; virus de la enfermedad de Borna; Astroviruses Chronic infectious neuropathic agents (CHINAs): Scrapie (Tabla 1).

Grupo de riesgo 3. Riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces: Familia *Arenaviridae*: virus de la coriomeningitis linfocítica, cepas neurotróficas. Familia *Bunyaviridae*: *Bunyavirus* sin clasificar, Hantaan, fiebre hemorrágica coreana y virus de la nefrosis epidémica incluyendo el virus del síndrome



pulmonar por Hantavirus; virus de la fiebre del valle de Rift.

Familia *Flaviviridae*: virus de la fiebre amarilla (tipo salvaje); virus de la encefalitis de St. Louis; virus de la encefalitis japonesa; virus de la encefalitis del valle de Murray. Familia *Herpesviridae*: *Herpesvirus* ateles; *Herpesvirus* saimiri. Familia *Retroviridae*, Subfamilia: *Lentivirinae*: virus de la inmunodeficiencia humana (HIV todos los aislados). Familia *Rhabdoviridae*: género *Vesiculovirus* (cepas tipo salvaje); género *Lyssavirus*, virus de la Rabia. Familia *Togaviridae*: género *Alphavirus*, virus de la encefalitis equina del este; Encefalitis equina venezolana, Chikungunya (excepto línea TC-83); encefalitis equina del oeste (Tabla1).

Grupo de riesgo 4. Riesgo individual y poblacional elevado. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente.

Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces: Familia *Arenaviridae*: virus de Lassa, Junín y Machupo, Sabia, Guanarito. Familia *Bunyaviridae*: género *Nairovirus* Crimean-Congo hemorrhagic fever. Familia *Filoviridae*: virus de Marburg; virus de Ebola. Familia *Flaviviridae*: complejo de la encefalitis Tick- borne; incluyendo encefalitis rusa, de primavera verano; virus del bosque de Kyasanur; virus de la fiebre hemorrágica de Omsk. Familia *Herpesviridae*: Subfamilia *Alphaherpesvirinae*: género *Simplexvirus*, Herpes B virus (virus del mono) (Tabla1).

Tabla 1. Relación de los grupos de riesgo, Niveles de bioseguridad, Prácticas y equipo

Grupo de riesgo	Nivel de Bioseguridad	Tipo de Laboratorio	Prácticas de laboratorio	Equipo de seguridad
1	Básico Nivel 1	Enseñanza e investigación básicas	TMA	Básico: bata, en su caso cubrebocas y guantes
2	Básico Nivel 2	Servicios de atención primaria: Diagnóstico, investigación	TMA y Ropa protectora, señalización de riesgo biológico	Igual al nivel 1 y CSB para posibles aerosoles
3	Contención Nivel 3	Diagnóstico especial, investigación	Igual que nivel 2 más, ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire	CSB y medios de contención primaria
4	Contención máxima Nivel 4	Unidades de patógenos peligrosos	Igual que nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético salida con ducha y eliminación de residuos	CSB clase III o trajes presurizados junto con CSB clase II, autodecave de doble puerta a través de la pared, aire filtrado

TMA: Técnicas Microbiológicas.

CSB Cámara de seguridad biológica

Fuente: Guía de cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana 14.NOM-087 SEMARNAT-SSA1-2002



Manejo de Residuos Biológico-Infeciosos.

Marco jurídico: El 14 de septiembre de 2005 se publicaron en el Diario Oficial de la Federación, las Bases de Colaboración que celebran la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, con la participación de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, y la Secretaría de Salud, con la participación de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, para coordinar esfuerzos y vigilar el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. De acuerdo con dicha Norma, sobre el manejo de RPBI, para que un residuo sea considerado RPBI debe de contener agentes biológico-infecciosos. La norma señala como agente biológico-infeccioso a cualquier organismo que sea capaz de producir enfermedad.

Consecuencias del manejo inadecuado de RPBI

Todas las personas expuestas a RPBI corren riesgo de contaminación a través de una exposición accidental por un mal manejo. Pueden infectarse a través de cortes en la piel, o absorción a través de las membranas mucosas, y/o lesiones con objetos punzo-cortantes

Importancia de realizar la adecuada clasificación y envasado de los RPBI.

La etapa de clasificación fundamental en el manejo de RPBI, para evitar riesgos a la salud y daños al medio ambiente, lo cual permite una mejor administración de los recursos, reduciendo los gastos de operación. Por lo que es necesaria la cooperación de todo el personal involucrado.

Características de los recipientes para la disposición de los residuos

Las bolsas y los recipientes utilizados para el envasado de los RPBI, deberán de cumplir con las disposiciones mínimas de color, tipo de material, resistencia a la tensión, elongación, al rasgado, resistencia a la penetración y marcado; todos ellos establecidos en la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (Figura 1).

Recolección

Aun cuando en la Norma actual no se dan las especificaciones para llevar a cabo este paso, es necesario mencionar algunas consideraciones importantes para hacer la recolección de los RPBI de manera segura, dentro del laboratorio.

- a) Las bolsas de recolección no deben de llenarse más de un 80% de su capacidad.
- b) No se deben comprimir las bolsas.
- c) Cerrar las bolsas con un mecanismo de amarre seguro que evite que los residuos salgan (nudo o cinta adhesiva)



- d) Verificar que los contenedores estén bien cerrados y una vez llenos, no deben ser abiertos o vaciados.
- e) La basura común se colocará en botes o bolsas de plástico de cualquier color excepto roja o amarilla (Figura 1).

¿Cómo deberán ser envasados los RPBI?				
Clasificación	Edo. Físico	Envasado	Tipo de Envase	Color
Sangre	Líquido	Recipientes herméticos		Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno		Rojo
Patológicos	Sólidos Líquidos	-Bolsas de polietileno -Recipientes herméticos		Amarillo
Residuos no anatómicos	Sólidos Líquidos	-Recipientes herméticos -Bolsas de polietileno		Rojo
Objetos Punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos de polipropileno		Rojo

Figura 1. Clasificación y Manejo de Residuos Biológico Infecciosos
Fuente: Guía de cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-087 SEMARNAT-SSA1-2002

Material y Equipo de uso frecuente en un laboratorio de virología.

Para la eficiencia del trabajo en un laboratorio de virología, es importante disponer del material y equipo adecuados y en las condiciones de esterilidad y/o desinfecciones pertinentes.

Es importante que desde el inicio de las sesiones prácticas el alumno esté familiarizado con el material y los equipos que utilizará en el curso.

Materiales

Pipetas Pasteur

Tubos de ensaye de 15x100 mm

Gradillas

Mecheros

Bunsen



Ovoscopio

Jeringas de tuberculina de 1.0 ml graduadas en decimos

Micropipetas ajustables automáticas de 5-50; 50-200; 200-1000 μ l (en su caso)

Multipipetas de 12 canales ajustables automáticas de 25 200 μ l (en su caso)

Puntas de plástico con capacidad de 5-200 y 200-1000 μ l (en su caso)

Botellas de plástico de 25 cm y de 80 cm

Criotubos de 1.8 ml

Termómetro

Equipo de laboratorio

Incubadora 37°C

Campana de flujo laminar horizontal o vertical (en su caso)

Centrífuga clínica

Refrigerador Congelador (en su caso)

Agitador magnético Autoclave

Medios de cultivo, reactivos y sustancias de laboratorio

Medio de cultivo MEM (Minimal Essential Medium) (en su caso)

Triptosa fosfato broth (TPB) (en su caso)

Solución buferada fosfatada (PBS)

Alcohol al 70%

Hipoclorito de sodio al 2%

Equipo de bioseguridad

Bata

Cubre bocas

Cubre pelo (Cofia)

Guantes de látex

Equipos de protección colectiva

Son elementos de ayuda en caso de emergencias, deben mantenerse en buen estado y al alcance para que su uso pueda realizarse con la rapidez requerida. Además, deben estar debidamente señalizados. En relación con la bioseguridad, la exposición a los diferentes factores de riesgo en el laboratorio puede ser elevada si no se toman en cuenta las medidas adecuadas. Por esta razón es imprescindible contar con una adecuada señalética que indique con un solo golpe de vista los elementos de rescate, riesgo o peligro y de la conducta a seguir para protegernos, la señalización se rige por formas geométricas, colores, símbolos y textos cortos o letras y es de suma importancia que el



alumno pueda reconocerlas y genere una cultura de respeto y responsabilidad en relación al tema. En la figura 2, se aprecian las señalizaciones básicas a considerar.

Para la eficiencia del trabajo en el laboratorio, es importante disponer del material y equipo adecuados y en las condiciones de esterilidad y/o desinfecciones pertinentes.

Desinfección y esterilización:

La desinfección consiste en eliminar microorganismos de alguna superficie, pero no necesariamente todas las formas de vida microbianas.

En el manejo de los desinfectantes es importante conocer su espectro de actividad, los riesgos ligados a su uso y las recomendaciones del fabricante. Es importante considerar que la limpieza previa es fundamental para lograr una correcta desinfección o esterilización.

Entre los principales grupos de desinfectantes están los alcoholes (etanol al 70%), compuestos fenólicos triclosán y cloroxilenol, cuaternarios de amonio (cloruro de benzalconio 0.4-1.6%), aldehídos (formaldehído 5%, glutaraldehído 2%), cloro (hipoclorito de sodio 1g/L), yodóforos, oxidantes (peróxido de hidrógeno al 3%, ácido peracético al 0.01-0.02%).

La esterilización es un proceso mucho más exhaustivo y específico que permite la eliminación de formas de microorganismos. El método más eficaz para esterilizar el material de laboratorio es la aplicación de vapor de agua a presión (autoclave) con un ciclo de 15 minutos a 121°C, 15 lb de presión, condiciones que pueden variar dependiendo del material a esterilizar.

Para la bioseguridad en el laboratorio la desinfección y esterilización de instrumentos y superficies del área de trabajo constituye la forma más adecuada de evitar contagios.

Propósito de la práctica

Conocer y emplear las medidas de bioseguridad, el manejo de residuos y los métodos de desinfección y esterilización que pueden emplearse en el laboratorio de virología.

Tiempo de realización de la práctica

Tres horas.



Materiales, reactivos y/o equipo

Material	Reactivos	Equipo
Bata limpia, cubrebocas Zapatos cerrados. MATERIAL DE CRISTALERÍA 7 Tubos de ensaye no estériles 5 Cajas de Petri no estériles Tubos de ensaye no estériles. Agua destilada Papel para envolver material a esterilizar	etanol 70% algodón	Autoclave

Desarrollo metodológico de la práctica

Inicio puntual.

Haber leído la práctica correspondiente.

Antes de iniciar el docente aclara dudas.

El docente explicará las medidas de bioseguridad, el manejo de residuos, en su caso, así como la señalización existente en el laboratorio

Practicar el lavado minucioso de manos

Practicar la desinfección de mesas

Localizar y conocer el equipo de laboratorio con apoyo del docente.

Practicar el procedimiento de esterilización:

- 1) Colocar 2.5 L de agua destilada en la autoclave.
- 2) Disponer el material a esterilizar sobre una plataforma evitando amontonamiento. Los frascos deben estar con la tapa floja.
- 3) Cerrar y atornillar la tapa de la autoclave.
- 4) Verificar que la llave de salida se encuentre abierta.
- 5) Encender la fuente térmica para hervir el agua dentro del autoclave.
- 6) Purgar hasta 5' después que se vea salir por la llave de escape solo vapor.



- 7) Cerrar la llave.
- 8) Controlar el aparato de registro que puede ser un manómetro calibrado en grs./cm² o lbs/sq.in (libras por pulgada cuadrada), o un termómetro. Cuando el aparato registre 1.054 grs./cm², 15 lbs/sq.in, 121°C, se empezará a contar el tiempo.
- 9) Mantener el registro constante durante 15-20 minutos.
- 10) Apagar la fuente térmica y dejar enfriar sin abrir.
- 11) Cuando la temperatura o presión haya descendido, abrir la llave de escape de vapor.
- 12) Abrir la autoclave. Los materiales salen húmedos por el contacto con el vapor. Aquellos que estén envueltos en papel deberán secarse en la estufa, ya que el papel mojado es muy fácil de romper y el material se contaminaría nuevamente.
- 13) Al término de la práctica el alumno entrega el material y realiza la limpieza del Área de trabajo.

Resultados

Reporte de práctica con evidencias fotográficas

Disposición de residuos

En esta práctica no se generan residuos.

Actividad de integración o cuestionario

- 1) Explica por qué es importante la bioseguridad en el laboratorio
- 2) De acuerdo con el manejo de residuos biológico-infecciosos, como deben manejarse y envasarse los agentes infecciosos
- 3) Menciona tres ejemplos de virus del grupo de riesgo 3, indicando a que especie (s) afectan (n).
- 4) ¿Cuál es la diferencia entre desinfección y esterilización?
- 5) ¿Qué papel tienen la desinfección y la esterilización en la bioseguridad?



Práctica 2

Diluciones más utilizadas en virología

Introducción

La disminución de la concentración de un soluto en forma constante en una serie ordenada de tubos conteniendo un diluyente, nos permite obtener diluciones seriadas. Las diluciones seriadas más utilizadas en el laboratorio de virología son las de factor de dilución 2 (dobles) y las de factor de dilución 10 (decuples). Las diluciones son utilizadas para determinar el contenido o la actividad viral en una suspensión de concentración desconocida, lo que se conoce como "titulación". Al preparar una dilución seriada, se utiliza un diluyente que no afecte el material que estamos diluyendo: virus, anticuerpos, moléculas biológicas, células (soluta). Un diluyente muy utilizado es la solución salina fisiológica 0.85 %. Frecuentemente ésta puede ser amortiguada con fosfatos a un pH de 7 a 7.4, adquiriendo el nombre de solución tampón de fosfatos (PBS). Otras soluciones son la de Ringer, caldo triptosa fosfatado, suero normal al 10%, solución salina tamponada con o sin rojo de fenol.

Diluciones dobles seriadas:

Este procedimiento implica preparar diluciones tales como: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, e indica que disminuimos la concentración del soluto dos veces de un tubo a otro. Se coloca un volumen constante de diluyente (ejemplo:1 ml) en una serie de tubos y un volumen igual del soluto (virus) se adiciona al primer tubo, se homogeniza 7 veces, posteriormente, el mismo volumen es transferido al siguiente tubo. Este procedimiento se repite hasta el último tubo, en el cual debe desecharse el excedente (Fig1).

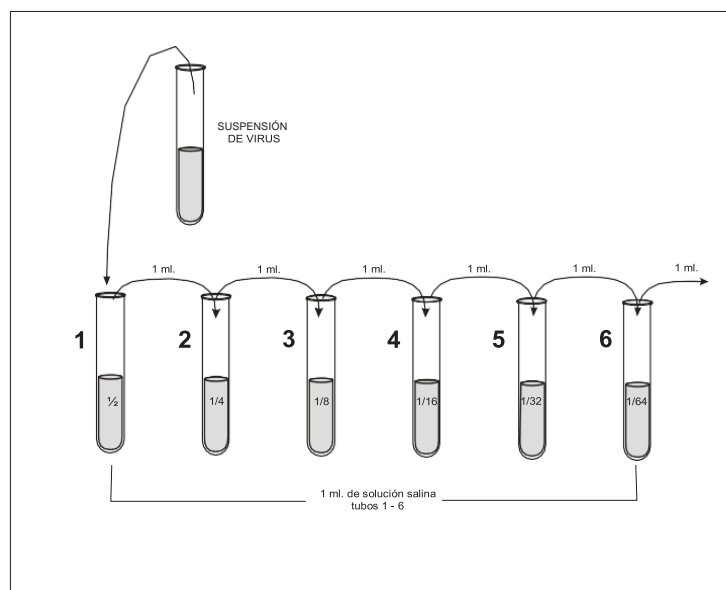


Figura 1



Diluciones decuples seriadas:

Al hacer diluciones decuples seriadas implica preparar diluciones como:

Diluciones expresadas en forma de proporción:	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	1:100,000
que corresponden a:					
Diluciones expresadas en forma de exponente	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}

Para prepararlas se coloca un volumen constante de diluyente en una serie de tubos, que corresponde a 9 décimas partes del volumen que se necesita trabajar. Una décima parte del virus (soluto) se coloca en el primer tubo y se homogeneiza. Una décima parte del volumen del primer tubo se transfiere al segundo tubo. Este procedimiento se repite hasta el último tubo, desechándose el exceso de volumen, de este tubo; la concentración del soluto se reduce 10 veces de un tubo a otro. (Fig.2).

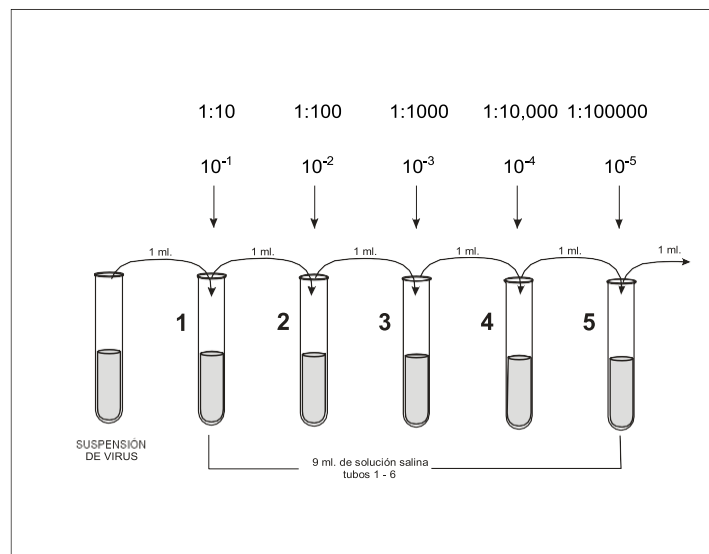


Figura 2

Ambas diluciones en serie pueden utilizarse para realizar pruebas virológicas como la prueba de hemoaglutinación viral (HA), la prueba de medición de la infectividad viral o en pruebas serológicas, como la prueba de inhibición de la hemoaglutinación viral (HI). En todas ellas se busca el "Punto Final", que es la máxima dilución en la se observa el 100% de la actividad biológica a medir y que su inverso es el "Título" de la prueba", representa la concentración hipotética del virus en la solución sin diluir y que debe expresarse por mililitro. Si el Punto final en una prueba se observa en la dilución 1:64, el título es 64 y las unidades corresponden a la prueba que se utiliza.



Diluciones en pasos:

Para preparar las diluciones en pasos, no existe un procedimiento establecido, se puede tomar la dilución inicial y los pasos que se crean más convenientes para llegar a la dilución requerida. Una forma práctica de obtener el factor de dilución que se necesita cuando solo se utiliza un paso es dividir el factor de dilución que se requiere entre el factor de dilución con que se quiere iniciar o bien el que se tiene. Ejemplo: Preparar una dilución 1/ 600 en un volumen de 10 ml.

Dilución tubo 1	FD que se requiere/FD que se tiene	Factor de dilución	Dilución tubo 2
1:6	$600 \div 6 = 100$	X 100	1:600
1:8	$600 \div 8 = 75$	X 75	1:600
1:20	$600 \div 20 = 30$	X 30	1:600

Si se elige la primera opción se prepararía de la siguiente manera (Fig.3):

$$10 \div 6 = 1.66$$

$$10 \div 1.66 = 8.34$$

El primer tubo llevaría 8.34 ml de diluyente y 1.66 ml de virus, quedando una dilución inicial de 1:6.

$$10 \div 100 = 0.1$$

$$10 \div 0.1 = 9.9$$

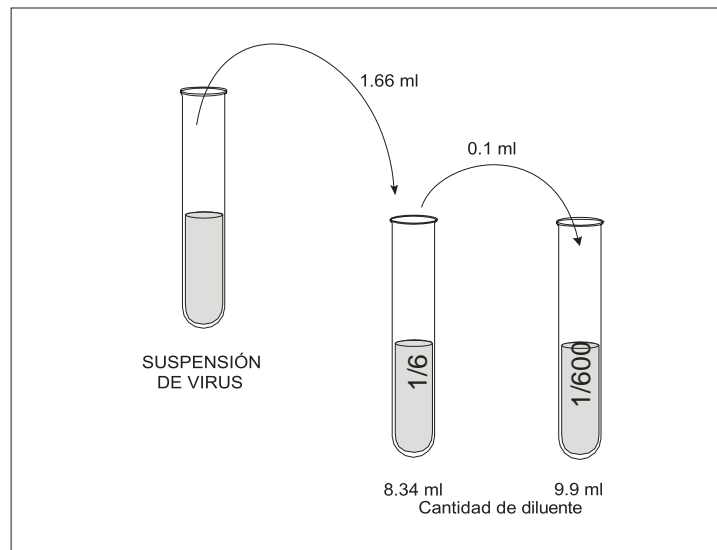


Figura 3



Propósito de la práctica

Practicar las diluciones más utilizadas en el laboratorio de virología.

Tiempo de realización de la práctica

Tres horas

Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Bata Calculadora		
Material por solicitar	Reactivos por solicitar	
1 gradilla 7 tubos vacutainer de 10 ml sin esterilizar 7 pipetas serológicas de 1 o 2 ml 1/100 1 pipeta serológica estéril de 5 ml 1/10 1 propipeta	1 tubo o frasco con 30 ml de agua destilada. 1 frasco con colorante vegetal.	

Desarrollo metodológico de la práctica

Realizar los cálculos necesarios para preparar las siguientes diluciones:

- a. Una dilución decuple seriada a partir de una dilución inicial de 1:2 en un volumen inicial de 5 ml en 5 tubos.
 - b. Calcular como preparar 5 ml. de una dilución 1:20,000 en dos pasos
1. Preparar la dilución en serie siguiendo la metodología ya establecida:
- a. Calcular el soluto y diluyente para el primer tubo
 - b. Calcular el soluto y diluyente para los tubos 2-5
 - c. Dispensar la cantidad de diluyente correspondiente a cada tubo con la primera pipeta
 - d. Medir la cantidad de soluto que lleva el primer tubo y depositarlo en este, sin introducir la pipeta, dejar caer el soluto, desechar la pipeta



- e. Homogeneizar con una pipeta limpia siete veces la mezcla, medir la cantidad a transferir y pasarla al tubo tres, sin introducir la pipeta en el diluyente, solo dejarla caer. Desechar la pipeta
 - f. Continuar con los tubos siguientes hasta terminar la dilución
2. Preparar la dilución en pasos siguiendo la metodología ya establecida

Resultados

Reporte si las diluciones de colorante coincidieron en su coloración tanto en la dilución en pasos como en la serie (lo que indica que midió y trabajó correctamente), apoye con evidencia fotográfica, integre cuestionario y portada de identificación

Disposición de residuos

El contenido de los tubos será eliminado en las tarjas.

Los tubos y pipetas serán lavados y secados para su entrega.

Actividad de integración o cuestionario.

1. ¿Para qué se utilizan las diluciones en el laboratorio de virología?
2. ¿Cuáles son los diluentes más utilizados al realizar las diluciones de las suspensiones virales?
3. Cuáles son las diluciones más utilizadas en el laboratorio de virología



Práctica 3

Hemoaglutinación viral

Introducción

Ciertos virus tienen la capacidad de unirse a glóbulos rojos de diferentes especies, debido a la presencia de unas proyecciones presentes en su envoltura viral llamadas espículas o hemoaglutininas, a este fenómeno se le conoce como hemoaglutinación viral. La unión de estas hemoaglutininas con sus receptores en los glóbulos rojos provoca que las partículas virales actúen como puentes entre los glóbulos rojos formando una red de aglutinación que puede apreciarse a simple vista.

Este fenómeno fue descrito por Hirst y Mc Clelland en 1941, quienes observaron que cuando se mezclaban los líquidos amnióticos y alantoideos con eritrocitos en el embrión de pollo, estos se aglutinaban con la presencia del virus de la influenza. Investigaciones posteriores a ésta, han demostrado que muchos virus aglutinan los glóbulos rojos de aves adultas y de ciertos mamíferos, algunos ejemplos se muestran en la siguiente tabla:

FAMILIA	GENERO O ESPECIE	TIPO DE GLÓBULO ROJO Y TEMPERATURA.
<i>Parvoviridae</i>	Virus adenoasociados tipo 4	Humano, cobayo. 4°C
<i>Papoviridae</i>	Virus polioma	Cobayo 4°C
<i>Adenoviridae</i>	La mayoría de los tipos	Mono, rata 37°C
<i>Poxviridae</i>	Viruela	De algunas aves 37°C
<i>Picornaviridae</i>	Virus Coxackie Virus Echo Rinovirus	Humanos, vacunos 4°C
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza tipo A y B	Aves, humano, cobayo. 4°C
<i>Paramyxoviridae</i>	Parainfluenza, Parotiditis	Aves, humano, cobayo, 4°C
<i>Rhabdoviridae</i>	Rabia	Ganso 4°C



Existen algunos factores por parte del virus que pueden influir en la prueba como son la cepa viral, el número de pases, sistema hospedero en que se replicó; así como edad y sexo de la especie de la que se obtuvieron los glóbulos rojos. La temperatura, pH y osmolaridad también pueden afectar la prueba.

La prueba de hemoaglutinación viral puede utilizarse para detectar virus por una prueba cualitativa rápida en placa, en una placa se coloca una gota de la muestra viral sospechosa y se le adiciona una gota de una suspensión de glóbulos rojos lavados y a una concentración del 3%. La mezcla se homogeneiza y se incuba a temperatura ambiente. La lectura se realiza en un período máximo de 3 minutos. La presencia de aglutinación que se observa por la formación de grumos será un resultado positivo (Figura 1).

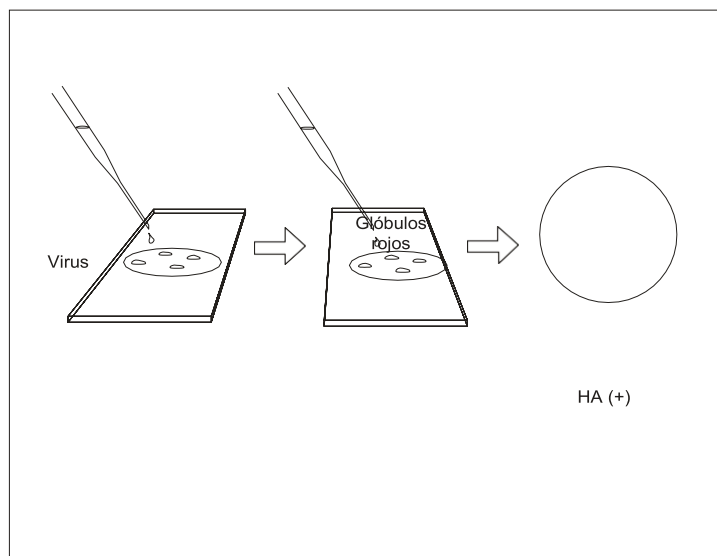


Figura 1. Prueba de hemoaglutinación rápida en placa

También para la titulación viral, mediante un método cuantitativo, rápido y sencillo que consiste en hacer diluciones dobles seriadas de la suspensión viral en solución salina fisiológica en tubos y mezclar con una suspensión normalizada de glóbulos rojos (generalmente del 0.25 al 1%), de la especie afín al virus a titular. La prueba se incuba a temperatura ambiente y se lee en un período máximo de una hora. Deben hacerse lecturas cada 15 minutos y la lectura final se hace cuando los controles de la prueba muestran el efecto biológico de la prueba.

Interpretación de la prueba: positiva, en aquellos tubos donde los glóbulos rojos se unen al virus, se forman puentes múltiples de gran tamaño que sedimentan en el fondo del tubo y forman una capa delgada de aglutinación característica. En los tubos donde no hay virus suficiente para unirse a los glóbulos rojos, estos también sedimentan en el



fondo del tubo formando un botón de sedimentación de glóbulos rojos característico, será un resultado negativo (Figura 2).

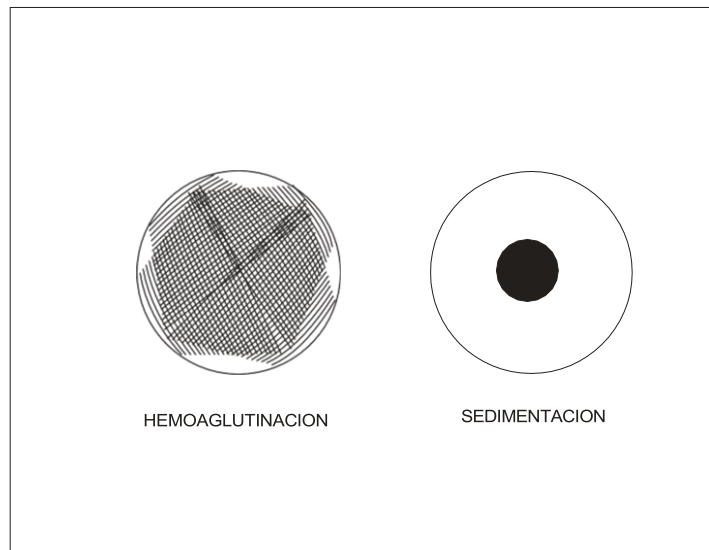


Figura 2. Fondos de tubo de la prueba de hemoaglutinación viral en tubo, con resultado positivo (hemoaglutinación) y negativo (sedimentación).

Algunos virus como el de Newcastle, poseen una enzima llamada neuraminidasa, la cual actúa óptimamente a 37 grados centígrados, su sustrato es el ácido N acetil-neuroamínico que forma parte del receptor de los glóbulos rojos. Esto ocasiona que después de cierto tiempo se lise el receptor del glóbulo rojo, separándose los glóbulos rojos del virus, produciendo el fenómeno de elución viral. Este fenómeno se puede retardar a 4 grados centígrados. Los glóbulos rojos eluidos no podrán ser reaglutinados por el mismo virus, porque sus receptores han sido destruidos, sin embargo, estos glóbulos rojos pueden ser hemoaglutinados por otros virus siempre y cuando posean receptores afines a dicho virus.

Con la ayuda de los fenómenos de hemoaglutinación y elución viral se pueden purificar suspensiones de virus contaminadas o si se desea, concentrar alguna suspensión viral.

Propósito de la práctica



El alumno realizará e interpretará la prueba de hemoaglutinación viral en placa y en tubo

Tiempo de realización de la práctica

Tres horas

Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Masking tape Cubre bocas Guantes de látex (1 por equipo) Lentes de seguridad (1 por equipo)		
Material por solicitar	Reactivos por solicitar	
1 gradilla 10 tubos vacutainer de 10 ml., limpios sin esterilizar. 1 portaobjetos. 1 palillo de madera. 2 pipetas serológicas de 1 o 2 ml 1/100, estériles. 1 propipeta.	Frasco con 8 ml de Solución Salina Fisiológica estéril. Frasco con 0.5 ml de suspensión de virus de Newcastle con título desconocido. Frasco con 7 ml de suspensión de glóbulos rojos de ave al 0.75%.	
Material por grupo	Reactivos por grupo	Equipo por grupo
Frasco de torundas con alcohol Contenedor para inactivación química de material contaminado por el virus	Frasco gotero con 10 ml de glóbulos rojos de ave al 3%	Ovoscopio



Desarrollo metodológico de la práctica

- 1) Detectar la presencia de virus de Newcastle en la suspensión que le proporcionaron utilizando la prueba rápida en placa. Colocar una gota de la muestra viral sospechosa y adicionar una gota de una suspensión de glóbulos rojos al 3%, homogenizar la mezcla con un palillo e incubar a temperatura ambiente durante máximo tres minutos, realizar la lectura. La presencia de aglutinación (formación de grumos) será un resultado positivo.
- 2) Si su resultado es positivo proceda a titular su suspensión utilizando una prueba en tubo como se indica a continuación.
- 3) Colocar los 10 tubos en la gradilla.
- 4) Identificar con masking tape los tubos del 1 al 8 con la dilución que le corresponda, el tubo 9 como control de virus y el tubo 10 como control de glóbulos rojos.
- 5) Calcular una dilución D O B L E seriada de virus en SSF, en 8 tubos a partir de una dilución inicial 1/5 con un volumen final de 0.5 ml.
- 6) Adicionar con la primera pipeta la SSF a los tubos de la serie (1 a 8), 0.25 ml al tubo nueve y 0.5 ml al tubo 10.
- 7) Adicionar con la misma pipeta el virus al primer tubo y 0.25 ml al tubo 9.
- 8) Homogenizar con la misma pipeta y transferir al tubo dos y así hasta el tubo 8. Desechar el volumen sobrante en el recipiente que se le indique, para su inactivación.
- 9) Homogenizar la suspensión de glóbulos rojos al 0.75%
- 10) Adicionar con la segunda pipeta a todos los tubos de la prueba 0.5 ml de la suspensión de glóbulos rojos de ave al 0.75% (Cuadro 1).

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dilución	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	Virus	GR
SSF	0.8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5
Virus NC	0.2	Transferir 0.5							0.25	-
G.R.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Cuadro 1. Cantidades de los reactivos de la prueba de Hemoaglutinación en tubo



- 11) Homogenizar la prueba agitando suavemente la gradilla.
- 12) Incubar la prueba a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 13) Realizar la lectura de la prueba a los 15, 30, 45 y 60 minutos, hacer la lectura final cuando los controles hayan trabajado. Si los controles no trabajan después de una hora, la prueba no es válida. En el tubo control de virus debe observarse hemoaglutinación, en el tubo control de glóbulos rojos sedimentación. El punto final de la prueba será la máxima dilución en la que se observe 100 % de hemoaglutinación.

Resultados

Muestre al instructor su prueba y lea el título de esta.

Reporte el resultado de la prueba de HA rápida en placa y de la prueba en tubo. Apóyese en el ejemplo de la Figura 3., para realizar la lectura del resultado de su prueba.

En la tabla 1., esquematice el resultado que observa en el fondo de cada tubo.

Con una "X" indique en que tubo se observó el punto final (la máxima dilución en donde se observe 100% de hemoaglutinación).

Realice el cálculo de las unidades hemoaglutinantes en cada tubo, se considera que en el punto final hay una unidad hemoaglutinante (1 UHA), que corresponde a la mínima cantidad de virus capaz de hemoaglutinar al 100% de los glóbulos rojos de la especie que se adicionó a una concentración "x", exprese el título de la prueba por mililitro. El título de la prueba es el recíproco del punto final y se expresa en unidades hemoaglutinantes (UHA) por ml. Integre el cuestionario y portada de identificación

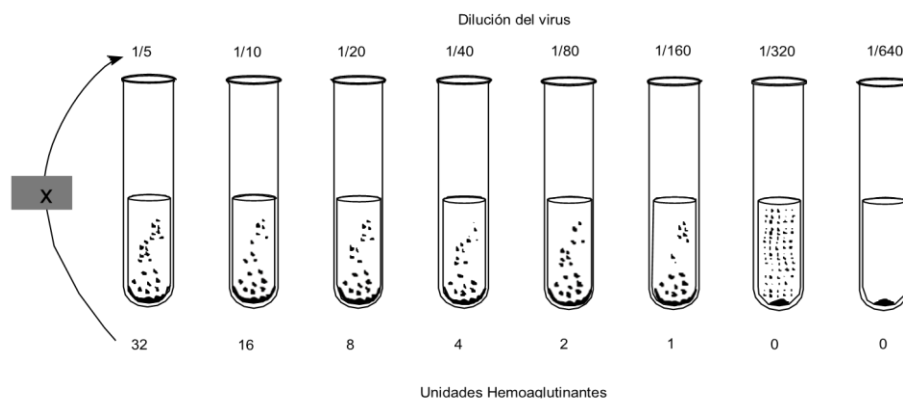
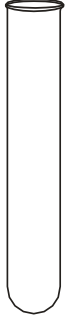

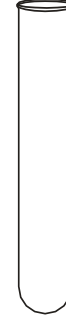

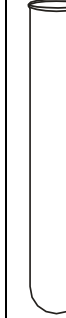
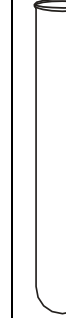

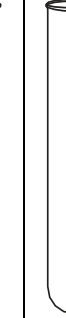


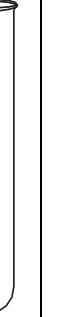


Figura 3. Ejemplo de una prueba de HA en tubo en donde el título del virus es de 160 UHA con glóbulos rojos de "X" especie a una concentración "X"/ml



Lectura obtenida											
PF:											
UHA											
TITULO											

Disposición de residuos

Los tubos con su contenido, así como las pipetas y portaobjetos que tuvieron contacto con el virus serán inactivados químicamente en el contenedor que se indique, durante 10 minutos. Una vez inactivado su contenido será eliminado en la tarja, el material de cristal será lavado y secado para su entrega.

Los palillos deben ser inactivados químicamente y eliminados en la basura municipal. Los tubos o frascos que contenían la suspensión de glóbulos rojos y solución salina podrán lavarse y secarse para su entrega sin necesidad de inactivarse.

Actividad de integración o cuestionario.

1. Defina el fenómeno de hemoaglutinación viral.
2. Defina el fenómeno de elución viral.
3. Escriba los usos de la Hemoaglutinación viral.



Práctica 4

Inoculación de diferentes virus en el embrión de pollo

Introducción

Los huevos de aves embrionados son un valioso medio para el cultivo de virus, ya que son una fuente rica de células vivas, además de ofrecer una variedad de tejidos en los cuales el virus puede replicarse de acuerdo con su tropismo. Su bajo costo, la facilidad de manejo sin necesidad de equipo especializado o costoso, además de la presencia del cascarón que lo mantiene libre de contaminación externa, lo hacen un método conveniente para mantener semillas virales, producir antígenos y vacunas.

Para obtener buenos resultados, al utilizar el embrión de pollo se debe ser muy cuidadoso al seleccionar los proveedores de estos. Las granjas productoras de huevo fértil deben poseer medidas de manejo y alimentación adecuadas que garanticen la viabilidad y resistencia del embrión. De preferencia deben obtenerse embriones libres de patógenos específicos (SPF), en caso de no ser así entonces utilizar embriones de granjas libres de infecciones que puedan ser transmitidas en forma vertical, sobre todo cuando se requiere cultivar virus aviares. Asimismo, deben de proceder de granjas donde no vacunen contra antígenos iguales o relacionados con los virus en estudio, ya que los anticuerpos maternos encontrados en el saco vitelino pueden interferir en la réplica viral. Es conveniente tener un proveedor establecido ya que esto asegura la uniformidad en la producción. Se pueden utilizar huevos embrionados de otras especies como pato, pavo y codorniz. Para utilizar el embrión de pollo como medio de cultivo viral, es importante conocer su estructura anatómica (Fig.1):

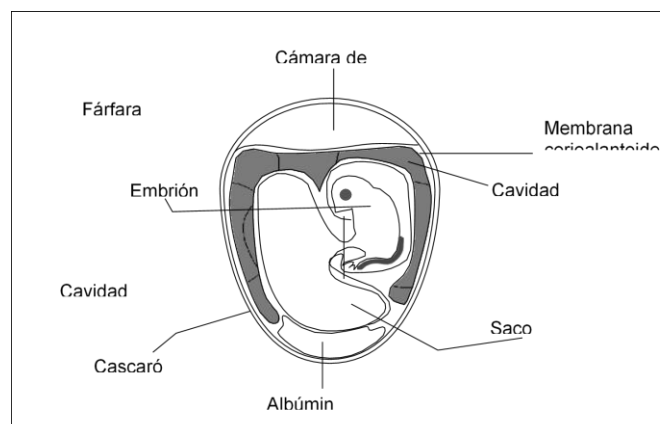


Figura 1. Estructura del embrión de pollo



Vías de inoculación en el embrión de pollo:

Membrana corioalantoidea (MCA):

Para esta vía se utilizan embriones de 10 –12 días de edad, el volumen de inoculación es de 0.1 a 0.5 ml.

La membrana corioalantoidea funciona como un órgano respiratorio y se encuentra muy vascularizado. Esta vía es apropiada para el cultivo de virus variólicos, laringotraqueítis aviar y en general los epiteliotropos. En esta vía se cosechan las membranas para la obtención el virus.

Las técnicas para MCA son:

Método A (Fig. 2): este método es simple y consiste en inocular el material infeccioso a través de la cámara de aire sobre la MCA para que difunda sobre toda la superficie de esta.

- 1) Revisar en el ovoscopio al embrión, verificar viabilidad y marcar cámara de aire.
- 2) Colocar el huevo con la cámara de aire hacia arriba.
- 3) Desinfectar la superficie a inocular.
- 4) Perforar 6 a 7 mm arriba de la cámara de aire
- 5) Inocular con aguja del 22 x 1", depositar primero el inoculo en la fáfara y después introducir toda la aguja para rasgar la fáfara y MCA.
- 6) Sellar con pegamento líquido o parafina
- 7) Incubar a 37 grados centígrados.
- 8) Revisar al ovoscopio los embriones cada 24 horas para verificar viabilidad. Los embriones que mueran dentro de las primeras 24 horas pueden atribuirse a otra causa.

Método B (Fig.3): con este método se asegura que todo el inoculo es depositado en la MCA, ya que se forma una cámara de aire falsa.

- 1) Revisar en el ovoscopio al embrión, verificar viabilidad y marcar una zona contraria al embrión libre de vasos sanguíneos.
- 2) Colocar al embrión en un plano horizontal.
- 3) Desinfectar la superficie de inoculación.
 - una en el polo superior.
 - otra en la zona contraria al embrión, libre de irrigación.



- 4) Perforar en los sitios señalados en el punto 3.
- 5) Con una bombilla succionar en la perforación hecha en el polo superior frente al ovoscopio hasta observar que se forma una cámara de aire en el otro punto de perforación.
- 6) Inocular con aguja del 27 x ½", depositar el inóculo en la MCA
- 7) Sellar los dos puntos de perforación con pegamento líquido o parafina.
- 8) Incubar en posición horizontal con la nueva cámara de aire hacia arriba a 37 grados centígrados.
- 9) Revisar al ovoscopio cada 24 horas para verificar viabilidad. Los embriones que mueren dentro de las primeras 24 horas pueden atribuirse a otra causa.

Cavidad alantoidea (CA):

Para inocular esta vía se utilizan embriones de pollo de 9 a 12 días de edad, el volumen de inoculación es de 0.1 a 0.2 ml. Los virus que se replican en la CA son los virus de Newcastle y Bronquitis infecciosa. Esta vía tiene la ventaja de la simplicidad de su técnica de inoculación y de cosecha del líquido alantoideo, que resulta de gran utilidad cuando se necesitan preparar grandes cantidades de antígenos. (fig. 4)

- 1) Revisar en el ovoscopio al embrión, verificar viabilidad y marcar la cámara de aire.
- 2) Colocar el huevo con la cámara de aire hacia arriba
- 3) Desinfectar la superficie de inoculación 3 mm debajo de la cámara de aire.
- 4) Perforar.
- 5) Inocular introduciendo una aguja del 27 x ½"
- 6) Sellar con pegamento líquido o parafina
- 7) Revisar al ovoscopio cada 24 horas para verificar viabilidad. Las muertes del embrión dentro de las primeras 24 horas son por otra causa.

Cavidad amniótica (Cam):

Para esta vía de inoculación se pueden emplear embriones de 7 a 15 días de edad, el volumen de inoculación es de 0.1 a 0.2 ml. La edad de los embriones depende del tipo de virus que se quiera replicar. Los virus de replicación lenta se benefician con la prolongación del período de incubación de los embriones. Están expuestas a la infección la capa epitelial interna del amnios y la epidermis del embrión. Los movimientos de deglución y respiración de los embriones más desarrollados llevan el agente infeccioso hacia las mucosas altas del aparato respiratorio y gastroentérico. (Fig.5)



- 1) Revisar en el ovoscopio al embrión, verificar viabilidad y marcar cámara de aire.
- 2) Colocar el huevo con la cámara de aire hacia arriba.
- 3) Desinfectar la superficie de inoculación, 5 mm arriba de la cámara de aire, del lado donde se encuentre el embrión.
- 4) Perforar.
- 5) Inocular con aguja del 22 x 1 ½", introducir toda la aguja.
- 6) Sellar con pegamento líquido o parafina.
- 7) Incubar a 37 grados centígrados
- 8) Revisar al ovoscopio cada 24 horas para verificar viabilidad. Las muertes del embrión durante las primeras 24 horas son por otra causa.

Saco vitelino (SV):

Se emplean embriones de 5 a 8 días de edad, el volumen de inoculación es de 0.1 a 1.0 ml. El saco vitelino está formado por una membrana de células en constante incremento. A partir del día 12, el vitelio se deseca progresivamente y aumenta al mismo tiempo la fragilidad de la membrana. Durante las últimas 24 a 48 horas, el saco vitelino queda incluido en la cavidad abdominal. El virus de la infección de la Bolsa de Fabricio, de la enfermedad de Marek, de la Encefalomiелitis aviar y de la Artritis aviar son algunos de los que pueden replicarse por esta vía. (fig.6)

- 1) Revisar en el ovoscopio al embrión
- 2) Colocar el huevo con la cámara de aire hacia arriba.
- 3) Desinfectar la superficie de inoculación: 5 mm arriba de la cámara de aire del lado contrario a donde se encuentra el embrión.
- 4) Perforar.
- 5) Inocular con aguja del 20 x 1 ½"
- 6) Sellar con pegamento líquido o parafina.
- 7) Incubar a 37 grados centígrados.
- 8) Revisar al ovoscopio cada 24 horas para verificar viabilidad. La muerte dentro de las primeras 24 horas es por otra causa.



Algunas veces es necesario hacer pases ciegos antes de detectar la réplica viral. Los embriones que mueren por efecto de la réplica viral deben sacarse de la incubadora lo más pronto posible para evitar cambios del tejido o inactivación térmica del virus. Cuando los embriones no mueren pueden ser sacrificados por refrigeración al menos por 24 horas, antes de realizar la cosecha de los líquidos embrionarios.

Propósito de la práctica

El alumno practicará la replicación viral en el embrión de pollo.

Tiempo de realización de la práctica

Tres horas

Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos por solicitar por equipo	Equipo
2 jeringa de insulina estéril 2 jeringa de 3ml con aguja del 22 X 1 ½" estéril 1 recipiente pequeño con hielo o un refrigerante 1 frasco pequeño de pegamento blanco líquido 1 encendedor 1 teléfono celular por equipo Cubre bocas (todos los integrantes) Guantes de látex (1 por equipo) Lentes de protección (1 por equipo) Tijeras		



Material por solicitar por equipo	Reactivos por solicitar	
1 mechero 1 perforador 1 charola porta-huevos. 8 embriones de pollo de 9 días.	1 frasco con virus de Newcastle 1 frasco con virus de Laringotraqueitis 1 frasco con virus de Bronquitis infecciosa 1 frasco de virus de la Viruela aviar	
Material por grupo		Equipo por grupo
1 frasco con torundas con alcohol.		1 ovoscopio 1 incubadora

Desarrollo metodológico de la práctica

- Colocar los embriones en una charola porta huevo
- Revisar en el ovoscopio los embriones, para verificar viabilidad y marcar cámara de aire.
- Ubicar el sitio o vía de inoculación, rotular con el nombre del virus a inocular y número de equipo.
- Realizar la técnica aséptica en el área de trabajo.
- Encender el mechero para generar área de esterilidad
- Desinfectar la superficie de los huevos, en el punto de inoculación marcado, dejar secar.
- Colocar la suspensión viral en la charola con hielos o sobre el refrigerante y cargarla en la jeringa a utilizar
- Desinfectar el perforador con una torunda con alcohol
- Perforar el punto de inoculación
- Proceder a la inoculación en ambiente de esterilidad:

Virus de Newcastle:

- Paramixovirus (ARN)
- Vía de inoculación: CA.
- Volumen de inoculación: 0.1 ml



- Tiempo de incubación: Se clasifican por el tiempo que tarda en matar al embrión:
- Cepas velogénicas: 36 a 48 hr (Querétaro)
- Cepas mesogénicas: 48 a 72 hr. (Roaking)
- Cepas lentogénicas: más de 72 hrs. (B1, Lasota). Cepas vacunales, a veces no matan al embrión.

Virus de Laringotraqueitis aviar:

- Herpesvirus (ADN)
- Vía de inoculación: MCA: por cámara de aire o por cámara falsa.
- Volumen de inoculación: 0.2 ml
- Tiempo de incubación: 5 a 6 días

Bronquitis infecciosa:

- Coronavirus (ARN)
- Vía de inoculación: CA
- Volumen de inoculación: 0.1 ml.
- Tiempo de incubación: 4 a 5 días. No siempre lo mata.

Viruela aviar:

- Avipoxvirus (ARN)
 - Vía de inoculación: MCA: cámara de aire o por cámara falsa.
 - Volumen de inoculación: 0.2 ml.
 - Tiempo de incubación 5 a 6 días
-
- Sellar el sitio de inoculación con una gota de pegamento líquido.
 - Regresar a la incubadora los embriones
 - Transcurrido el tiempo de incubación los embriones se sacrifican por refrigeración para su revisión y cosecha viral.



NOTA: es importante trabajar rápido ya que la viabilidad de los embriones depende de que no permanezcan demasiado tiempo fuera de la incubadora

Resultados

Elabore un reporte fotográfico de los pasos que siguió para la inoculación de los embriones. Integre la actividad de integración/cuestionario y portada de identificación

Disposición de residuos

Los frascos con virus serán esterilizados para su eliminación en la basura municipal. Las jeringas serán eliminadas en los contenedores correspondientes: el cuerpo y capuchón en el contenedor indicado, las agujas en el contenedor de color rojo para punzocortantes

Las torundas con alcohol serán eliminadas en el contenedor para basura municipal

Los cubrebocas, cofias y zapatos quirúrgicos desechables y guantes de látex, deberán cortarse en pedazos pequeños de manera que queden irreconocibles, colocarse en la bolsa que indique el instructor para eliminarse en el contenedor de basura municipal.

Actividad de integración o cuestionario

Describe que salió bien en el desarrollo de la práctica y en su caso, que salió mal.

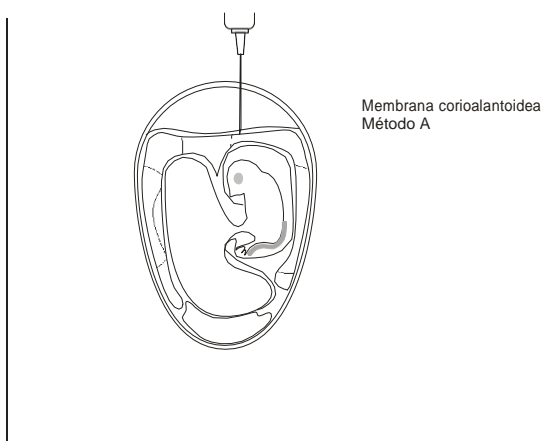


Figura 2

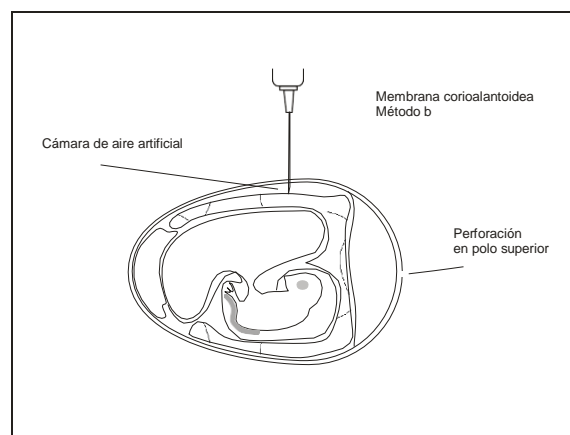


Figura 3

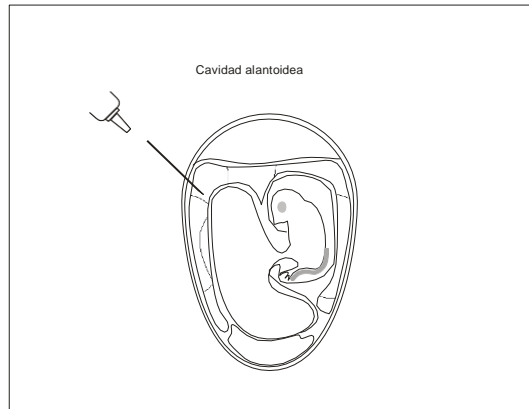


Figura 4

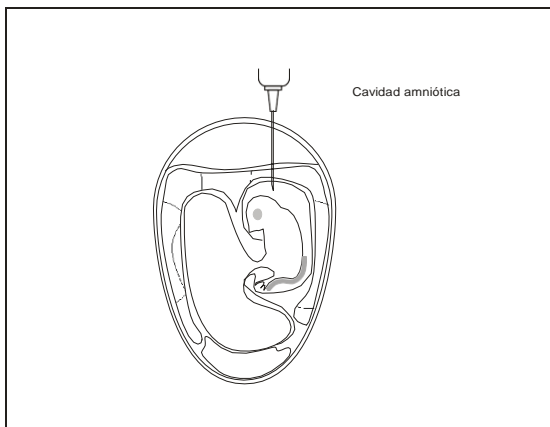


Figura 5

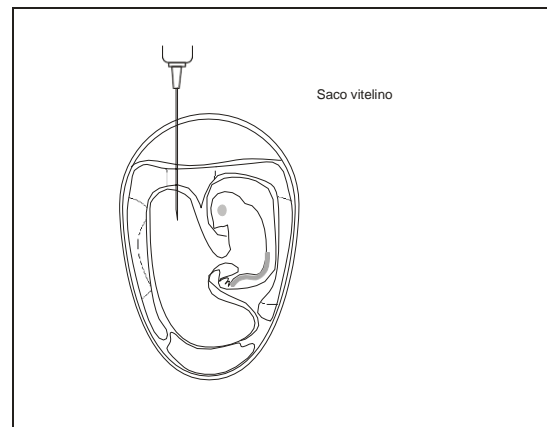


Figura 6



Práctica 5

Detección de lesiones en el embrión de pollo y cosecha viral

Introducción

La susceptibilidad de una célula a un virus (tropismo), se determina por la presencia de receptores específicos sobre la membrana celular y una capacidad metabólica de la misma para inducir la síntesis necesaria para la réplica viral.

Existen diferencias en los tropismos virales tanto *in vitro* como *in vivo*, que están determinados por la cápside; mientras que los ácidos nucleicos son pantotrópicos en el sentido de que pueden penetrar en una célula (que es refractaria al virus completo) e inducir la síntesis de una sola generación de virus que después de adquirir la cápside pierden su capacidad para penetrar en células refractarias.

El uso del embrión de pollo como sistema biológico para replicar virus, permite obtener una gran cantidad de partículas virales completas a un costo muy bajo, las cuales pueden utilizarse como:

- reactivos para diagnóstico en pruebas serológicas (antígeno).
- fuente de antígeno para la producción de biológicos.
- conservación de cepas virales.
- identificación de virus.

La identificación de virus se hace a través de la presencia de lesiones en el embrión de pollo y en los tejidos extraembrionarios. Cuando el virus replicado tiene la capacidad de hemoaglutinar, esta prueba permite corroborar la presencia del virus en los líquidos extraembrionarios.

Cuando un virus es replicado se debe estar seguro que el virus recuperado es el mismo que se inoculó, ya que cualquier sistema biológico utilizado pueden contener virus latentes que pueden ser activados por el material inoculado.



Propósito de la práctica

El alumno identificará la presencia de los virus inoculados en el embrión de pollo en la práctica anterior, mediante la detección de lesiones en el embrión de pollo, en las estructuras extraembrionarias y/o a través de la prueba de hemoaglutinación viral (HA) en los líquidos colectados.

Tiempo de realización de la práctica

Tres horas

Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Pinzas y tijeras estériles 2 jeringas de 5 ml con aguja del 18 X 1 ½", para colectar líquidos extraembrionarios 2 Jeringas de 10 ml con aguja del 18 X 1 ½", para lavado de membranas corioalantoideas y buscar las lesiones. 1 jeringa de 10 ml con aguja del 20 X 1 ½", para 1 jeringa de 1 ml 1 recipientes plásticos con tapa roja estéril para toma de muestra. Masking tape 1 encendedor Cubre bocas (todos los integrantes) Guantes de látex (1 por equipo) Lentes de protección (1 por equipo) 1 teléfono celular por equipo para utilizar como fuente de luz en la revisión de membranas extraembrionarias Tijeras		
Material por solicitar	Reactivos	Equipo
Mechero 4 cajas de petri estériles (para lesiones en embriones y membranas extraembrionarias) Frasco con 100 ml de Solución salina fisiológica estéril. 2 portaobjetos 2 palillos de madera	Frasco gotero con una suspensión de glóbulos rojos al 3%	



Material por grupo	Reactivos por grupo	
Embriones inoculados en la práctica anterior, sacrificados por refrigeración. Contenedor para desechar estructuras del embrión Frasco con torundas con alcohol.		

Desarrollo metodológico de la práctica:

- 1) Trabajar en área estéril.
- 2) Desinfectar toda la superficie del cascarón donde se encuentra la cámara de aire.
- 3) Abrir cortando el cascarón por cámara de aire con ayuda de las pinzas y tijeras
- 4) Colectar los diferentes líquidos extraembrionarios de acuerdo a la vía de inoculación utilizada

Membrana corioalantoidea (MCA):

Este método es aplicable para cuando la membrana ha sido inoculada por la cámara de aire o por la cámara falsa:

Desechar los fluidos, saco vitelino y el embrión. La MCA queda adherida al cascarón. Con unas pinzas se separa y obtiene la MCA y se coloca en una caja de Petri.

La MCA se extiende y se lava con solución salina fisiológica estéril para su revisión.

Líquido alantoideo:

Se utiliza jeringa de 10 ml con aguja del 18 x 1 ½"

Insertar la aguja en cavidad alantoidea y aspirar el líquido. La cantidad colectada por huevo varía con la edad del embrión, en embriones de 12 días se colecta un promedio de 5 ml por huevo (Figura 1).

En caso de virus de Newcastle antes de colectar todo el líquido alantoideo, probar la presencia del virus mediante la prueba de Hemoaglutinación rápida en placa. Colocar una gota del líquido alantoideo en un portaobjetos y una gota de la suspensión de glóbulos rojos de ave al 3%, mezclar con ayuda de un palillo de madera y extender la



mezcla para facilitar la lectura, si la prueba es positiva (Figura 2), coleccionar todo el líquido y envasar.

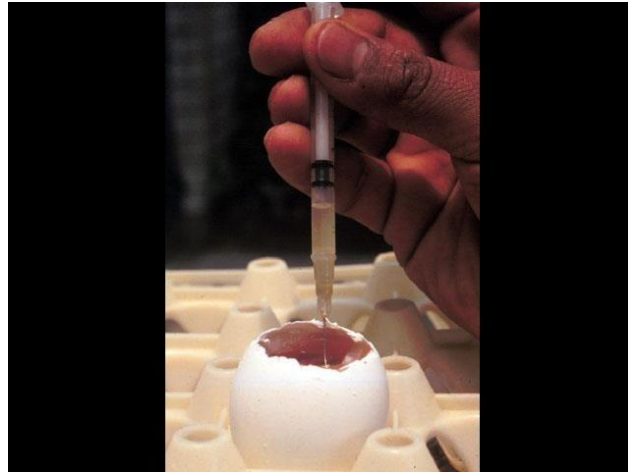


Figura 1. Cosecha de líquido alantoideo

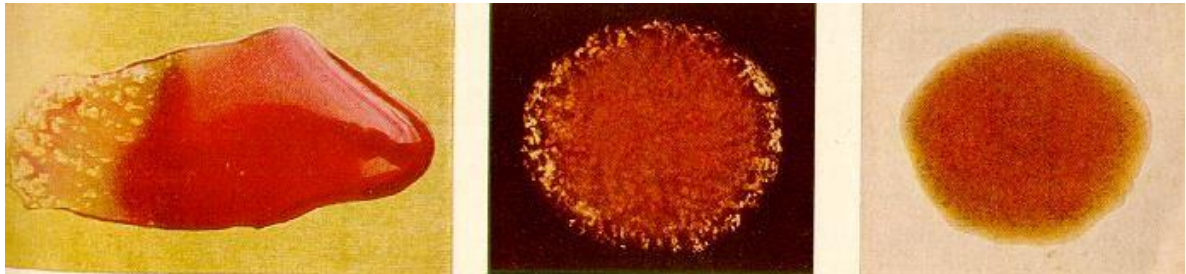


Figura 2. Prueba de hemoaglutinación en placa

Líquido amniótico:

Se utiliza jeringa de 10 ml con aguja de 20 x 1 ½”.

La fárfara y la MCA se rasgan en la base de la cámara de aire para permitir mejor visibilidad del amnios.

Insertar la aguja en la cavidad amniótica y aspirar el líquido. Envasar el líquido colectado.

Saco vitelino:

Se utiliza una jeringa de 10 ml con aguja del 14 x 1 ½”

Introducir la aguja rasgando la fárfara y MCA y llegar al saco vitelino. Aspirar el vitelio y envasarlo



- 5) Para los virus que producen lesiones, continuar con la revisión de lesiones en los embriones:

Virus de Newcastle:

El líquido alantoideo hemoaglutina, embrión muere y presenta congestión generalizada, hemorragias dérmicas generalizadas principalmente en la porción cefálica y extremidades (Figura 3). Se colecta el líquido alantoideo, membrana corioalantoidea y embriones.

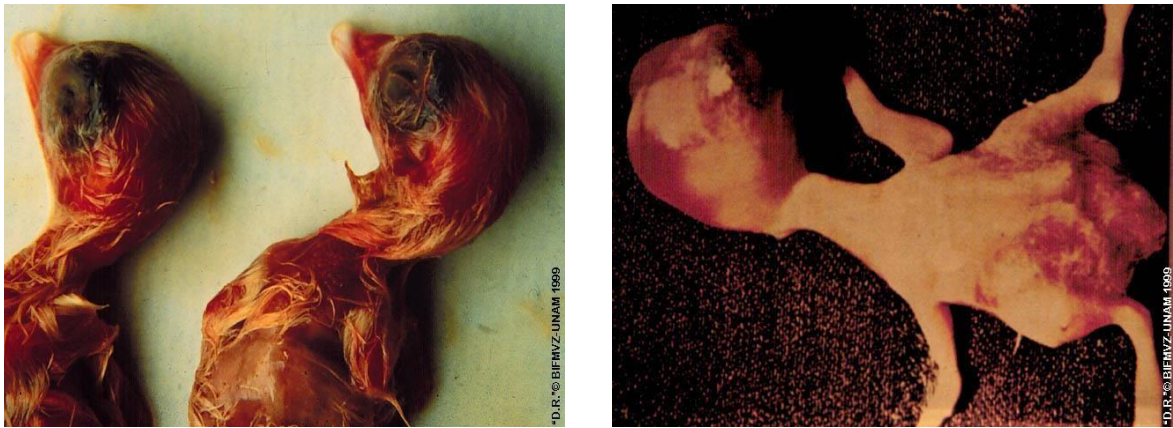


Figura 3. Lesiones producidas por el virus de Newcastle en el embrión de pollo

Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa:

Muerte del embrión cuando son cepas muy virulentas. MCA presenta zonas pustulosas en forma de placas de color blanco grisáceo o gris amarillento y edema intranucleares. Colectar membrana corioalantoidea y embriones. El virus produce cuerpos de inclusión.

Virus de la bronquitis infecciosa:

Enrollamiento y enanismo del embrión, desarrollo anormal del plumón, atrofia del dedo medio, fibrosis del amnios depósito de uratos en riñón, en ocasiones zonas necróticas en hígado. Después de varios pases se puede provocar la muerte del embrión.

Virus de Viruela aviar:

Membrana corioalantoidea con lesiones pustulosas, placas de color blanco grisáceo o gris amarillento. Engrosamiento y edema de la MCA y en ocasiones muerte embrionaria. Colectar Líquido alantoideo, membrana corioalantoidea y embrión. El virus produce cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos.



Figura 4. Lesiones producidas por el virus de la Bronquitis infecciosa en el embrión de pollo

Resultados

Reporte los cambios observados en los embriones de pollo que usted inoculó, apoye con evidencia fotográfica, concluya si el virus se replicó. Comente que salió bien y en su caso, que salió mal en el desarrollo de la práctica. Integre el cuestionario y portada de identificación

Disposición de residuos.

Los líquidos cosechados, las membranas extraembrionarias y los embriones serán envasados en una bolsa amarilla para residuos patológicos, para su almacenamiento temporal y entrega a disposición final.

Las jeringas se eliminarán en los contenedores correspondientes, el cuerpo y el capuchón en el que indique el responsable del laboratorio y las agujas en el contenedor de color rojo para punzocortantes.

Los palillos y portaobjetos utilizados para la prueba de Ha en placa serán inactivados químicamente durante 10 minutos. Los palillos se eliminarán en el contenedor para la basura municipal y los portaobjetos se lavarán.

Las torundas serán eliminadas en el contenedor para la basura municipal



Los cubrebocas, cofias y zapatos y guantes de látex, deberán cortarse en pedazos pequeños de manera que queden irreconocibles, colocarse en la bolsa que indique el instructor para eliminarse en el contenedor de basura municipal.

Actividad de integración o cuestionario.

1. Escriba las vías de inoculación que pueden realizarse en el embrión de pollo.
2. ¿Cómo comprueba la réplica viral en el embrión de pollo?
3. ¿Qué ventajas tiene el uso del embrión de pollo en comparación con otros sistemas biológicos?
4. ¿Qué usos tiene el embrión de pollo en virología?



Práctica 6

Técnicas de PCR y RT-PCR

Introducción

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o Polymerase Chain Reaction

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por K. Mullis y sus colaboradores en 1985 ha revolucionado la biología molecular y la medicina molecular. Es una técnica “in vitro” utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Antes del desarrollo de esta técnica solo podían obtenerse cantidades mínimas de un gen específico, ahora incluso un único ejemplar de un gen puede amplificarse con la PCR hasta obtener un millón de ejemplares en tan solo unas horas.

La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ésta se obtiene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: taq polimerasa.

Cuando se realiza una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN. “*In vitro*”, en un tubo se mezclan los reactivos necesarios para hacerlo:

- La Taq polimerasa, el ADN del organismo objeto de estudio y en el que se encuentra el fragmento de ADN que se requiere sintetizar.
- Los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores u oligos), necesarios para que se inicie la transcripción.
- Dinucleótidos (dNTPs), para elaborar las múltiples copias del ADN de interés.

Además, se proveen las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente, cierto pH; determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂; KCl y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa.

La PCR es una técnica que consta de 3 pasos, que forman un ciclo, éste se repite un número determinado de veces, dependiendo del fragmento que se requiere amplificar, usualmente se utilizan entre 30 y 40 ciclos.



Paso 1: Desnaturalización: se produce por calor, el ADN se calienta hasta una temperatura de 92 a 96°C, con el objetivo de separar la doble hebra de ADN en dos cadenas sencillas. El calor rompe los enlaces de hidrógeno que unen a las bases, mientras que los enlaces entre la desoxirribosa y los grupos fosfatos permanecen intactos.

Paso 2: Alineación: la temperatura se reduce a 40 a 65°C, para permitir el alineamiento de cada uno de los primers (cadenas cortas de nucleótidos) con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Los primers son segmentos de ADN de cadena simple, son sintetizados de forma artificial en el laboratorio y diseñados de manera que permitan definir los límites del fragmento de ADN que se desea replicar. Para que el alineamiento se pueda dar, los primers deben ser complementarios a la secuencia de bases que componen el tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde.

Paso 3: Extensión: una vez que los primers se unieron a sus secuencias complementarias, la temperatura se eleva a 72°C y la enzima Taq polimerasa se usa para replicar las hebras. La enzima comienza el proceso de extensión o polimerización, uniendo nuevos nucleótidos correspondientes en dirección 5' a 3', obteniéndose la hebra complementaria de DNA (Figura 1).

La reacción de PCR, se realiza en un termociclador, un instrumento que de forma automática controla y alterna la temperatura durante periodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos de los siguientes pasos:

Al término del primer ciclo de estos tres pasos, el tramo de ADN blanco se habrá duplicado y estará disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. Una vez que se han realizado varios ciclos en secuencia, se obtiene como resultado la amplificación exponencial del segmento de ADN delimitado por los primers.

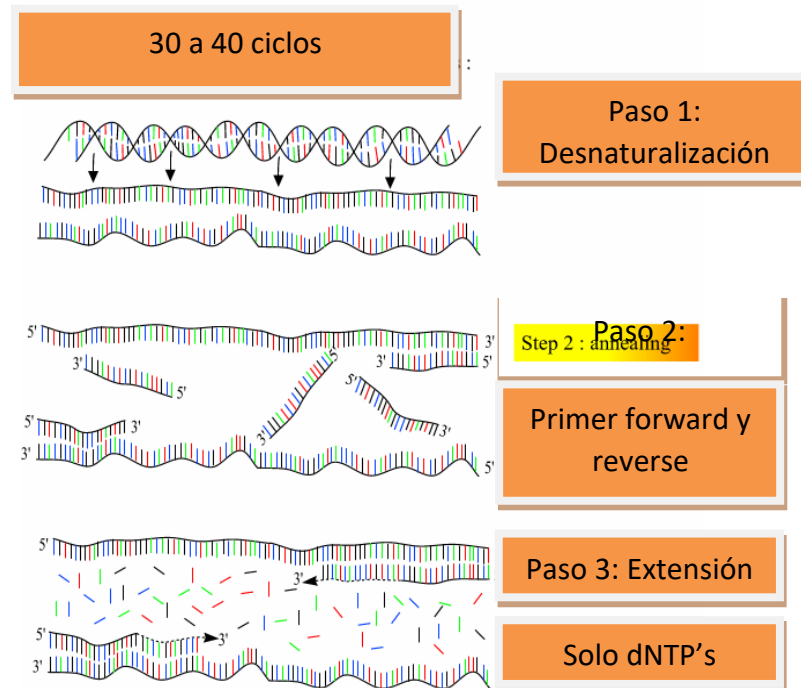


Figura 1. Los pasos que comprenden un ciclo de amplificación de la técnica de PCR

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT- PCR) o Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.

Es una variante de la PCR, en la RT-PCR una hebra de ARN es retrotranscrita en ADN complementario (ADNc), usando una enzima llamada Transcriptasa Reversa. El resultado de este primer paso es el ADN complementario (ADNc), el cual se amplifica en una PCR tradicional. Este ADNc ya no lleva los intrones (regiones del ADN que deben ser eliminados de la transcripción primaria del ADN a ARN), de e esta manera se genera un ARNm formado exclusivamente por exones (regiones que codifican para una determinada proteína) o secuencias que se traducen. Esto ha permitido darle a esta técnica uno de sus usos más importantes: insertar genes eucariotas en organismos procariontas.

Es una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de ARN muy bajo. Sus aplicaciones son en el campo del diagnóstico molecular y en la investigación científica. Puede utilizarse como método de detección molecular de genes,



para estudiar el genoma de virus ARN, otro uso es la cuantificación de la expresión génica, mediante la combinación de esta técnica con el análisis de Northern blot.

Para que la Transcriptasa Reversa sintetice una cadena de ADNc a partir de ARN, se requiere de un sitio de iniciación. Existen tres tipos de iniciadores que pueden utilizarse para hibridar el ARN:

- Hexámeros (random primer): son los menos específicos, consisten en una mezcla de hexanucleótidos con secuencias al azar, por lo que se obtienen transcripciones inespecíficas a partir de todo el ARN
- Oligo dT: es un oligonucleótido compuesto de varias timinas (12-18) que se unen específicamente a la cola de poliadeninas que caracteriza al ARNm
- Iniciadores específicos: los diseña el investigador y permite la síntesis de ADNc, exclusivamente del mensajero que contiene la secuencia que se pretende amplificar.

Los pasos para realizar la RT-PCR son (Figura 2).:

1. Unión del primer a la secuencia de ARN objetivo.
2. Transcripción reversa: la polimerasa Transcriptasa Reversa cataliza la extensión del primer mediante la incorporación de nucleótidos complementarios.
3. Fin de transcripción reversa, se obtiene la hebra del DNAc complementario al ARN.
4. PCR

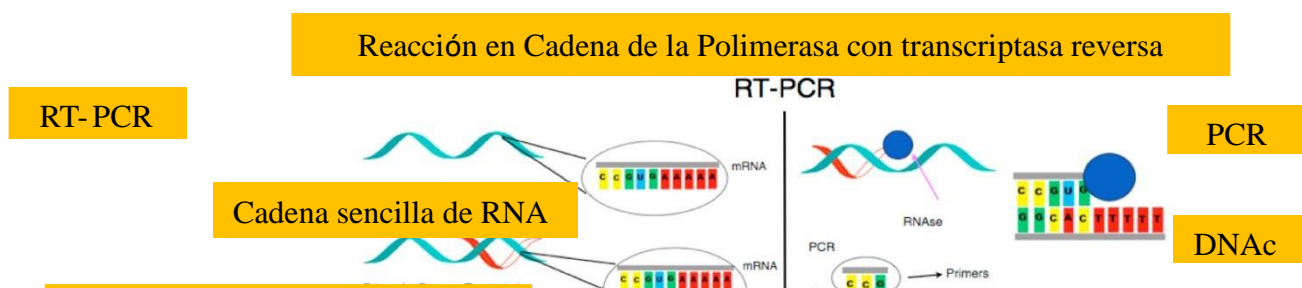


Figura 2. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

Propósito de la práctica

Conocer de forma general el material, equipo, reactivos, preparación de las muestras, interpretación de resultados y aplicación de las técnicas de PCR y RT-PCR.



Tiempo de realización de la práctica

Dos horas

Materiales, reactivos y/o equipo

Material	Reactivos	Equipo
Tijeras Bata limpia, cerrada, de mangas largas y largo a la rodilla. Cubrebocas Cofia Guantes de látex Zapatos quirúrgicos desechables Un teléfono celular por equipo		

Desarrollo metodológico

Se realizará una visita guiada al Laboratorio de Biotecnología del CU. UAEM Amecameca.

Los alumnos (as) deben presentarse con cabello recogido, poco maquillaje, sin aretes ni anillos

Haber leído el protocolo de práctica.

Escuchar con atención la plática que el responsable del laboratorio dará, tomar evidencia fotográfica de la visita a lo largo de la explicación para integrar el reporte de resultados.

Resultados

Elabore un reporte escrito con evidencias fotográficas de las técnicas que se realizan en el Laboratorio de Biotecnología del CU. UAEM Amecameca, qué agentes infecciosos se identifican con estas técnicas. Integre el cuestionario resuelto y portada de identificación.



Disposición de residuos

Los cubrebocas, cofias y zapatos quirúrgicos desechables y guantes de látex, deberán cortarse en pedazos pequeños de manera que queden irreconocibles, colocarse en la bolsa que indique el instructor para eliminarse en el contenedor de basura municipal.

Actividad de integración o cuestionario.

1. Describa como se visualizan los productos de la PCR.
2. Qué es la electroforesis
3. Para que se utiliza el transiluminador de rayos ultravioleta (UV), en el laboratorio de biotecnología y que medidas de autoprotección deben emplearse al utilizarlo
4. Qué es el Bromuro de etidio, para que se utiliza en el laboratorio de Biotecnología.
5. Porque cuando se realizan estas técnicas se debe utilizar guantes de látex



VII. Referencias Bibliográficas

- Block S. Desinfection, sterilization and preservation. 2001. 5a ed. Lippincot William and Wilkins.1050pp. ISBN06383-30740-1
- Castillo, C.E., Gómez, A.F.: Manual de laboratorio de prácticas de virología. FMVZ-UNAM. 2006.
- Cotazar A. y E. Silva. 2004. E.P. PCR en: Métodos físicos y químicos en biotecnología. Instituto de Biotecnología. UNAM www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf Espinoza L. Guía práctica sobre la técnica de PCR en capítulo 17. www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf
- Cunningham, C.H.: Virología Práctica. Acribia. 3ª . Zaragoza España. 1971. Dulbecco, D. And Col.:Microbiology. Harper & Row. E.U. 1973.
- García A. 2002. Medidas de bioseguridad, precauciones estándar y sistemas de aislamiento. Rev. Enf. IMSS.10:27-30.
- George, S.C.: Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology. Camstock Publishing Associates. Garnell University Press. USA. 1978.
- Guía de cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-087--SEMARNAT-SSA1-2002. Protección Ambiental-Salud Ambiental-Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos
- Guía técnica de Señalización de Seguridad y Salud en el trabajo y laboratorio. (pdf
- Kurstak, E.: Viral Immunodiagnosis. Ed. E. Kurstak & Morissed. New York. 1974.
- Larski.: Virología para veterinarios. Prensa Médica Mexicana. 2ª .1989.
- Ley General de equilibrio ecológico y protección al ambiente. DOF. 5 de julio 2007
- Ley para la gestión integral de los residuos DOF 19 de junio 2007.
- Mendoza S, Alvarado J.L., Hernández E. Ciprián A. 2009. Manual de Diagnóstico Viroológico. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM
- Mohanty, S and Dutta, S.: Veterinary Virology. Philadelphia. 1981.
- Myers, R.: Immunology, a Laboratory Manual. Wm.C.Brown Publishers.Iowa. 1989
- Organización Mundial de la Salud Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, OMS. 2005.<http://www.insh.es/nshtWeb/Contenidos/Normatividad/Tecnicas/Ficheros/pdf>.
- Somma M., Querci M. Sesión nº6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en: Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos.

