

**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**Pasantía en el Laboratorio de Virología de la Escuela de
Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional**

Modalidad Pasantía

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Jenny Madrigal Varela

Campus Pbro. Benjamín Núñez

2015

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

MSc. María Antonieta Corrales Araya
Decana de la Facultad de Ciencias de la Salud

MSc. Laura Bouza Mora
Subdirectora de la Escuela de Medicina Veterinaria

Dr. Carlos Jiménez Sánchez
Tutor

Dr. Rafael Vindas Bolaños
Lector

Dr. Elías Barquero Calvo
Lector

28 de Agosto de 2015

DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza necesaria para concluir mi carrera con éxito. A mis padres por brindarme el apoyo que necesitaba para salir adelante a pesar de las adversidades. A mi hijo Sedrick por ser mi inspiración día tras día.

AGRADECIMIENTOS

Extiendo mi profundo agradecimiento a Dios por haberme permitido estudiar la carrera que siempre había anhelado. Al Dr. Carlos Jiménez Sánchez por abrirme las puertas para trabajar en uno de sus proyectos, lo que me dio la posibilidad de entrar a un mundo que me resultaba desconocido. A los Drs. Elías Barquero Calvo y Rafael Vindas Bolaños por su disponibilidad de participar en este proyecto, además de todos sus aportes como lectores. A doña Lourdes y a Rocío por mostrarme el trabajo de laboratorio, por “jalarme las orejas” cuando lo necesitaba, por aclarar mis dudas cuando las tenía y por todos los favores que me hicieron durante la realización de mi proyecto. A mis amigos Adriel Solano, Rodolfo Villagra (fofo), Edgar Alfaro, Pilar Muñoz, por estar conmigo en las buenas y las malas. A mis papás Marvin Madrigal y Rocío Varela, y a mi esposo Obett Hurtado por impulsarme a terminar mi proyecto de graduación. A la Dra. Laura Castro por preocuparse en llamarme para que pudiera entrar a la carrera a tiempo, sin ella tal vez no estuviera donde actualmente estoy. A mis profesores de carrera por darme las bases necesarias para que pudiera desenvolverme como profesional. Finalmente un especial agradecimiento al ser por el que vivo diariamente, que llena mi vida de luz y hace que todos los días trate de caminar lo más rectamente posible por este mundo: Sedrick Alonso Hurtado Madrigal. Te amo mi “bodoquito”.

TABLA DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDO.....	v
INDICE DE CUADROS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	3
1.2.1. <i>Importancia</i>	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 <i>Objetivo General</i>	3
1.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	3
2. METODOLOGIA.....	4
2.1 Materiales y métodos.....	4
2.1.1. <i>Lugar</i>	4
2.1.2. <i>Equipo y Materiales</i>	4
2.1.3. <i>Metodología</i>	4
2.1.4 <i>Registro y Análisis de datos</i>	7
2.1.5 <i>Horario de trabajo</i>	7
3. RESULTADOS.....	8
3.1 Casuística.....	8
3.1.1 <i>Área Aviar</i>	8
3.1.2 <i>Área Bovinos</i>	9
3.1.3 <i>Área Porcinos</i>	9
3.1.4 <i>Área Felinos</i>	10

3.1.5 Área caprinos	10
3.1.6 Área equinos.....	10
3.1.7 Área caninos.....	11
3.1.8 Otras técnicas realizadas	12
3.2 Implementación de protocolos	12
3.2.1 Implementación del PCR para el diagnóstico del virus del Distemper canino	12
3.2.2 Implementación PCR anidado para el diagnóstico del Virus de la Encefalitis Equina del Este.....	12
4. DISCUSION	14
4.1 Casuística.....	15
4.1.1 Área Aviar	15
4.1.2 Área Bovinos	15
4.1.3 Área Porcinos.....	16
4.1.4 Área Felinos.....	16
4.1.5 Área caprinos	17
4.1.6 Área equinos.....	18
4.1.7 Área caninos.....	18
4.1.8 Otras técnicas realizadas	19
4.2 Implementación de protocolos	20
4.2.1 Implementación del PCR para el diagnóstico del virus del Distemper canino	20
4.2.2 Implementación PCR anidado para el diagnóstico del Virus de la Encefalitis Equina del Este.....	20
4.2.3 Implementación del PCR para el diagnóstico de Reovirus Aviaries	20
5. CONCLUSIONES.....	21
6. RECOMENDACIONES.....	22
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	23

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Análisis realizados a muestras de origen aviar.....	8
Cuadro 2: Análisis realizados a muestras de origen bovino.....	9
Cuadro 3: Análisis realizados a muestras de origen felino.....	10
Cuadro 4: Análisis realizados a muestras de origen equino.....	11
Cuadro 5: Análisis realizados a muestras de origen canino.....	11
Cuadro 6: Resultados de PCR de Encefalitis Equina del Este.....	13

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. PCR para distemper canino	12
Figura 2. PCR anidado para Encefalitis equina del este	13
Figura 3. PCR para Reovirus aviar:.....	14

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGID: Inmunodifusión en gel de agar

CAE: Artritis Encefalitis Caprina

cDNA: Acido desoxirribonucleico complementario

CO₂: Dióxido de carbono

EEE: Encefalitis Equina del Este

EEO: Encefalitis Equina del Oeste

EEV: Encefalitis Equina Venezolana

ELISA: Ensayo inmunoenzimático

FNO: Fiebre del Nilo Occidental

ILT: Laringotraqueitis infecciosa aviar

LANASEVE: Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios

LVEMV: Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria

Nº: Número

OIE: Organización mundial de salud animal

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PRRS: Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

TFG: Trabajo Final de Graduación

UV: Ultravioleta

RESUMEN

El presente documento constituye el informe final de trabajo de graduación, modalidad pasantía, realizada por la estudiante Jenny Madrigal Varela en el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, en el período comprendido entre el 16 de Julio y el 7 de Diciembre del año 2012.

La pasantía se realizó con el objetivo de mejorar las destrezas y habilidades de la pasante mediante la participación en la organización, ejecución de procedimientos, interpretación de resultados e implementación de nuevos protocolos del Laboratorio de Virología.

EL periodo se dividió en tres partes: la primera constó de una introducción al laboratorio, la cual se basó en el conocimiento de su organización y funcionamiento con especial atención a la recepción y protocolización de las muestras; en la segunda parte se participó en la recepción y análisis de las muestras conforme iban ingresando al laboratorio y en la tercera parte se contribuyó con la implementación de protocolos de PCR establecidos por Frisk (1999), Linssen et al. (2000) y Xie et al. (1997), para Distemper canino, Encefalitis equina del Este y Reovirus aviar, respectivamente. Al final de la pasantía se logró participar en un total de 2855 análisis.

ABSTRACT

This document is the final report of a graduate work, internship modality by the student Jenny Madrigal Varela at the Laboratory of Virology, School of Veterinary Medicine of the National University in the period between 16 July and 7 December 2012.

The internship was conducted with the aim to improve the skills and abilities of the student through participation in the organization, implementation of procedures, results interpretation and implementation of new protocols at the Virology Laboratory.

The period was divided into three parts: the first consisted of an introduction to the laboratory, which was based on the knowledge of its organization and functioning with particular attention to the reception and logging of samples; in the second part the student took part in the reception and analysis of samples as they were entering the laboratory and in the third part she contributed to the implementation of PCR protocols established by Frisk (1999) Linssen et al. (2000) and Xie et al. (1997), for Canine Distemper, Eastern Equine Encephalitis and Avian Reovirus, respectively. At the end of the internship the student engaged in a total of 2855 analysis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Para enfrentar, diagnosticar, prevenir, controlar y erradicar las enfermedades virales se requiere de laboratorios especializados, esto con el objetivo de ayudar a los propietarios de las mascotas, productores, y entidades nacionales o internacionales; además de ser un sostén de diagnóstico para los veterinarios privados, y profesionales cuyo trabajo se relaciona con la medicina, biomédica y medicina comparativa (Dwight et al., 2004; MacLachlan & Dubovi, 2011).

Muchas enfermedades virales de animales se pueden diagnosticar tomando en cuenta los signos clínicos en conjunto con los hallazgos post mortem e histopatológicos; sin embargo, la medicina laboratorial siempre complementa el examen clínico del paciente (Meyer & Harvey, 1998; MacLachlan & Dubovi, 2011).

La vigilancia de los virus a nivel individual o a nivel de hato es muy importante, ya que su diagnóstico va a influenciar el manejo o pronóstico del animal; por otra parte, en el marco de reglamentos comerciales internacionales, la certificación de ausencia de ciertas enfermedades virales, debe acompañar a los animales exportados a países donde esas enfermedades son exóticas.

También la vigilancia se debe realizar para control de zoonosis, enfermedades emergentes o re-emergentes, tales como rabia, encefalitis equina venezolana, virus del Nilo Occidental, influenza aviar, entre otros. Finalmente la vigilancia se aplica en la transferencia de embriones, inseminación artificial, transfusión de sangre, y xeno- transplatación de tejidos y órganos de suinos a humanos (Wiegers, 1996; Swayne et al., 1998).

Es importante realizar el diagnóstico viral a nivel de país para tener conocimiento de la prevalencia y distribución de enfermedades virales, y determinar cómo afectan la economía del lugar, lo cual permite ejecutar programas de control y remoción de animales infectados (Wiegers, 1996).

En el trabajo de diagnóstico, la expresión final de la calidad es un resultado fiable. El advenimiento de las normas internacionales, como la serie ISO, y la aplicación de la gestión de calidad, han hecho que los laboratorios tengan un

sistema de calidad formal, visible y confiable (Wiegers, 1996; Murrell, 2006). Por eso es tan importante que un laboratorio tenga instalaciones adecuadas para el buen manejo y seguridad de las prácticas laboratoriales y velar que la colecta, identificación y transporte de especímenes a analizar sea lo más adecuado posible (especímenes frescos, bien identificados, tomados en el momento en que el animal muestre los primeros síntomas clínicos, y del sitio correcto de acuerdo al agente que se desea analizar) (Quinn et al., 1994; Herrero et al., 2004; OIE, 2013).

El Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional cuenta con personal calificado, equipo y métodos diagnósticos necesarios para la detección de los diferentes virus, en este sentido, este laboratorio es una herramienta imprescindible y confiable tanto para los médicos veterinarios privados, como para los médicos humanos, los profesores, y los que participan en la investigación en muchos campos relacionados con la medicina comparativa.

Los protocolos que utiliza el Laboratorio de Virología para reconocer infecciones por virus, incluyen métodos directos e indirectos. Esto según demuestren la presencia del virus o de alguno de sus componentes (antígeno o genoma viral) o bien, la respuesta de anticuerpos específicos por parte del huésped en el curso de la infección (OIE, 1996).

En el Laboratorio de Virología de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional, se trabaja en áreas como docencia (recibiendo y atendiendo a estudiantes, capacitando productores o profesionales de ciencias de la salud, y dando soporte completo, a los laboratorios de docencia de su especialidad), investigación (ejecutando proyectos que pretenden encontrar soluciones a los múltiples problemas de salud que aquejan a las poblaciones del país (humanas y animales), extensión (ofreciendo actividades de capacitación, información y divulgación a asociaciones profesionales, comunidades, hospitales, instituciones educativas, entre otros), venta de servicios (se realizan análisis frecuentes de al menos 30 virus, y 15 procedimientos diferentes, lo que lo hace muy accesible al público) (Jiménez, 2011).

1.2 Justificación

1.2.1. Importancia

Tomando en cuenta que hay más de 1938 especies de virus (MacLachlan & Dubovi, 2011), la clave para que el protocolo de abordaje de enfermedades infectocontagiosas sea exitoso, es poner en práctica las medidas de control y manejo necesarias para evitar que se infecten más individuos (Pritchard et al., 2003). El Laboratorio Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional contribuye a la resolución de los problemas de salud que aquejan a las poblaciones del país (humanas y animales) mediante la realización de diversos análisis.

El conocer el desempeño del Laboratorio de Virología y la cantidad de análisis que anualmente ejecuta (16.000 a 18.000) (Jiménez, 2011), acentúa el interés personal de desarrollar la pasantía en el mismo, pues ofrece la posibilidad de poner en práctica los conocimientos teórico- prácticos en el campo de la virología veterinaria adquiridos a lo largo de la carrera, para complementar el desarrollo profesional, ayudando a mejorar destrezas y habilidades.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Realizar una pasantía en el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional para mejorar mis destrezas y habilidades en este campo del conocimiento.

1.3.2 Objetivos específicos

- 1.3.2.1 Participar en la ejecución de los procedimientos laboratoriales realizados en el Laboratorio de Virología.
- 1.3.2.2 Colaborar en la organización y funcionamiento del Laboratorio.
- 1.3.2.3 Mejorar destrezas y habilidades en la realización e interpretación de análisis de laboratorio.
- 1.3.2.4 Participar en la realización de al menos 2000 análisis de laboratorio.
- 1.3.2.5 Implementar protocolos de PCR para los siguientes virus: Distemper canino, Encefalitis Equina del Este y Reovirus aviar.

2. METODOLOGIA

2.1 Materiales y métodos

2.1.1. Lugar

La pasantía se realizó en el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria, ubicada en el Campus Benjamín Núñez, Barreal de Heredia, Costa Rica. Dicho laboratorio cuenta con un área aproximada de 100 m² dividida en cinco áreas principales: recepción, almacenamiento y conservación de muestras, área de serología, área de balanzas y electroforesis, área de cultivo celular y PCR, y por último, una oficina para confección de informes y lectura de las pruebas inmunoenzimáticas.

2.1.2. Equipo y Materiales

El laboratorio cuenta con equipo básico, dentro del cual se puede citar: refrigeradoras, congeladores y ultracongeladores, centrífugas, balanzas, cabinas de flujo laminar vertical y horizontal, pH metro, cabina para PCR, triturador de tejidos, baños maría, cámaras de electroforesis, microscopio invertido, estereoscopio, incubadora de CO₂, computadoras, lavador de placas, termocicladores, transluminador UV, agitadores Vortex, pipetas, pipeteadores eléctricos, micropipetas individuales y múltiples, así como cristalería y material plástico desechable.

En relación con los reactivos y materiales de diagnóstico, el laboratorio empleó kits de diagnóstico importados (Biochek®, Idexx®, VMRD®, Symbiotics®, Ingenasa®, Megacor®, entre otros). Para el diagnóstico molecular se cuenta con los materiales necesarios para extracción de ácidos nucleicos, síntesis de ADN complementario y PCR.

2.1.3. Metodología

La pasantía tuvo una duración de 320 horas.

El trabajo se llevó a cabo de acuerdo con el cronograma establecido y constó de tres etapas: una etapa de introducción e inducción al laboratorio, una

etapa de práctica dentro de la rutina normal del laboratorio (recepción, protocolización, manejo y conservación de muestras, lectura y seguimiento de protocolos de diagnóstico, participación en los métodos y procedimientos de diagnóstico directos e indirectos), y una etapa de implementación de la técnica de PCR para el diagnóstico de algunos agentes virales relevantes en el medio como son: los virus de Distemper canino, Encefalitis Equina del Este y Reovirus aviar según se describe a continuación (las técnicas tuvieron el mismo equipo y protocolo base: se realizó la extracción de ARN con Trizol, luego se sintetizó un ADN complementario, empleando “randomprimers” y el kit Revert Aid Minus First Strand cDNA Synthesis, código K1632 de la empresa Fermentas. Posteriormente se realizó la PCR (la mezcla de reacción se elaboró con el kit 2X PCR Master Mix, catálogo Fermentas K1071, empleando un volumen total por tubo de 50 µl, con los primers que se necesitaban de acuerdo al virus correspondiente, y 2µl de cDNA). La reacción se completó en el termociclador Applied Biosystems modelo 2720, de acuerdo a las temperaturas y ciclos descritos por Frisk (1999), Linssen y colaboradores (2000) y Xie y colaboradores (1997) para Distemper canino, Encefalitis equina del Este y Reovirus aviar respectivamente. Los productos se visualizaron con un transluminador de luz UV tras una electroforesis en gel de agarosa al 2%).

2.1.3.1. Implementación del PCR para el diagnóstico del virus del Distemper canino. Este procedimiento se basó en el protocolo descrito por Frisk (1999). Después de realizar la extracción de ARN y sintetizar el ADN complementario, se realizó la PCR: se elaboró la mezcla de reacción con los primers F (ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT) y R (CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC), y 2 µl del cDNA. La reacción se completó con las siguientes temperaturas y ciclos: desnaturalización 94°C por un minuto; 40 ciclos de desnaturalización, annealing y extensión de 94°C durante un minuto, luego 59,5°C por dos minutos y 72°C por un minuto. Finalmente se realizó una extensión a 72°C por cinco minutos. Los productos de 287 pb se visualizaron con un transluminador de luz UV.

2.1.3.2. Implementación de PCR anidado para el diagnóstico del Virus de la Encefalitis Equina del Este. Se siguió el protocolo descrito por Linssen y colaboradores (2000). Después de realizar la extracción de ARN y sintetizar el ADN complementario, se realizó la primer PCR: se elaboró la mezcla de reacción con los primers EEE4 (CTAGTTGAGCACAAACACCGCA) y cEEE7 (CACTTGCAAGGTGTCGTCTGCCC), y 2 µl del cDNA. La reacción se completó con las siguientes temperaturas y ciclos: desnaturalización 94°C por minuto y medio; 35 ciclos de desnaturalización, annealing y extensión de 94°C durante veinte segundos, luego 64°C por treinta segundos y 72°C por veinte segundos. Finalmente se realizó una extensión a 72°C por cinco minutos. Para la reacción anidada se emplearon 2 µl de la PCR anterior y los primers EEE-5 (AAGTGATGCAAATCCAACCTCGAC) y cEEE-6 (GGAGCCACACGGATGTGACACAA). La reacción se completó con las siguientes temperaturas y ciclos: desnaturalización 94°C por minuto y medio; 25 ciclos de desnaturalización, annealing y extensión de 94°C durante veinte segundos, luego 65°C por treinta y cinco segundos y 72°C por diecisiete segundos. La extensión final fue a 72°C por cuatro minutos. Los productos de 262 pb se visualizaron con un transluminador de luz UV.

2.1.3.3. Implementación del PCR para el diagnóstico de Reovirus Aviaries. Se realizó el protocolo descrito por Xie y colaboradores (1997). Después de realizar la extracción de ARN y sintetizar el ADN complementario, se realizó la primer PCR: se elaboró la mezcla de reacción con los primers MK87 (GGT GCG ACT GCT GTA TTT GGT AAC) y MK88 (AAT GGA ACG ATA GCG TGT GGG) y 2 µl del cDNA. La reacción se completó con las siguientes temperaturas y ciclos: desnaturalización 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización, annealing y extensión de 94°C durante un minuto, luego 55°C por un minuto y 72°C por un minuto. Finalmente se realizó una extensión a 72°C por cinco minutos. Los productos de 532 pb se visualizaron con un transluminador de luz UV.

2.1.4 Registro y Análisis de datos

Se realizó un registro en una bitácora, de todos los casos en los que participé, de acuerdo con el número de protocolo asignado.

Para efecto del documento final del TFG, los datos se organizaron por especie de origen, tipo de muestra y análisis realizados. Los datos se analizaron de forma cualitativa mediante estadística descriptiva.

2.1.5 Horario de trabajo

El horario de trabajo fue de lunes a viernes de 8 am a 12 pm, aunque la jornada laboral en ocasiones se prolongaba de acuerdo con los requerimientos de las pruebas a realizar.

3. RESULTADOS

Para presentar los resultados obtenidos en esta pasantía, los datos se organizaron por especie de origen, tipo de muestra y análisis realizados, y por último se presenta los resultados de los nuevos protocolos implementados.

3.1 Casuística

3.1.1 Área Aviar

Durante la pasantía se participó en la ejecución de 2055 análisis de muestras de origen aviar, cuyo detalle se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Análisis realizados a muestras de origen aviar.

<u>Agente</u>	<u>Tipo de muestra</u>	<u>Análisis realizados</u>	<u>Total por agente</u>
Bronquitis infecciosa aviar	Sueros	ELISA	131
	Tráqueas	PCR	3
	Secresiones	Inmunofluorescencia	3
Bursitis infecciosa aviar	Sueros	ELISA	128
Influenza aviar	Sueros	ELISA	120
Laringotraqueítis infecciosa aviar	Sueros	ELISA	1290
	Tráqueas	PCR	193
Mycoplasma gallisepticum	Sueros	ELISA	66
Newcastle	Sueros	ELISA	121
<u>Total de análisis</u>			2055

Tal y como se observa en el cuadro anterior, el agente que demandó mayor número de análisis laboratoriales fue el virus de la Laringotraqueítis infecciosa aviar, con 1483 análisis. Además, con respecto a las técnicas empleadas, el

ELISA sobresale sobre las demás con un total de 1856 análisis, seguida del PCR con 196.

3.1.2 Área Bovinos

En lo que respecta a bovinos, se realizaron un total de 578 análisis, cuyo detalle se presenta en el cuadro 2.

Cuadro 2: Análisis realizados a muestras de origen bovino.

<u>Agente</u>	<u>Tipo de muestra</u>	<u>Análisis realizados</u>	<u>Total por agente</u>
Leucosis viral bovina	Sueros	ELISA	521
Rinotraqueítis infecciosa bovina	Sueros	Seroneutralización	15
	Pulmón	Aislamiento	2
Diarrea viral bovina	Sueros	ELISA	17
	Sueros	Seroneutralización	7
	Heces	Aislamiento	3
Coronavirus bovino	Heces	Inmunocromatografía	3
Papilomavirus bovino	Papilomas	Autovacuna	7
Rotavirus bovino	Heces	Inmunocromatografía	3
<u>Total de análisis</u>			578

Tal como se observa en el cuadro 2, el agente viral que mayor número de análisis demandó fue el virus de la Leucosis Bovina, con 521 análisis. En lo que respecta a las técnicas utilizadas, el ELISA acaparó el mayor número de pruebas con un total de 538 y fue seguido por 22 seroneutralizaciones, 7 autovacunas, 6 inmunocromatografías y 5 aislamientos en cultivo celular.

3.1.3 Área Porcinos

Con respecto a muestras de origen porcino, se participó en un total de 58 análisis, todos para diagnóstico de síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRS) mediante la técnica ELISA.

3.1.4 Área Felinos

En lo referente a muestras de origen felino, se participó en un total de 19 análisis, cuyo detalle se presenta en el cuadro 3.

Cuadro 3: Análisis realizados a muestras de origen felino.

Agente	Tipo de muestra	Análisis realizados	Total por agente
Leucemia felina	Sangre	Inmunocromatografía	9
Inmunodeficiencia felina	Sangre	Inmunocromatografía	9
Peritonitis infecciosa felina	Sangre	Inmunocromatografía	1
<u>Total de análisis</u>			19

Se logra observar en el cuadro 3 que todos los 19 análisis son de inmunocromatografía, y dentro de estos el virus de la Leucemia felina y el de la Inmunodeficiencia felina tienen la misma cantidad de análisis (9 análisis cada uno).

3.1.5 Área caprinos

En relación con los caprinos, se realizó un análisis del virus de la Artritis Encefalitis Caprina, utilizando la técnica de ELISA.

3.1.6 Área equinos

En lo referente a muestras de origen equino, se participó en un total de 120 análisis, cuyo detalle se presenta en el cuadro 4.

Cuadro 4: Análisis realizados a muestras de origen equino.

<u>Agente</u>	<u>Tipo de muestra</u>	<u>Análisis realizados</u>	<u>Total por agente</u>
Anemia infecciosa equina	Sueros	Inmunodifusión	119
Encefalitis equina venezolana, del este, del oeste y del oeste del Nilo	Sueros	ELISA de captura de IgM	1
<u>Total de análisis</u>			120

Según se desprende del cuadro 4, el mayor número de exámenes corresponde a anemia infecciosa equina, con 119 análisis y en lo que respecta a técnicas utilizadas, la prueba de inmunodifusión en gel de agar, acapara la mayoría, con un total de 119 pruebas.

3.1.7 Área caninos

En lo referente a muestras de origen canino, se participó en un total de 17 análisis, cuyo detalle se presenta en el Cuadro 5.

Cuadro 5: Análisis realizados a muestras de origen canino.

<u>Agente</u>	<u>Tipo de muestra</u>	<u>Análisis realizados</u>	<u>Total por agente</u>
Distemper canino	Sueros	Inmunocromatografía	3
	Pulmón	PCR	2
Papilomavirus canino	Papilomas	Autovacuna	12
<u>Total de análisis</u>			17

Tal y como se observa en el cuadro 5, la elaboración de autovacunas para papilomatosis canina representó la mayor parte de los procedimientos realizados a muestras de origen canino, con un total de 12. Otras técnicas realizadas fueron 3 inmunocromatografías y 2 PCR.

3.1.8 Otras técnicas realizadas

Durante la pasantía se realizaron seis tripsinizaciones y una titulación de vacuna.

3.2 Implementación de protocolos

3.2.1 Implementación del PCR para el diagnóstico del virus del Distemper canino

Tal como se observa en la línea 2 de la Figura 1, se obtuvo un resultado positivo (287 pb) (vacuna de distemper canino) mediante el protocolo de PCR descrito por Frisk (199

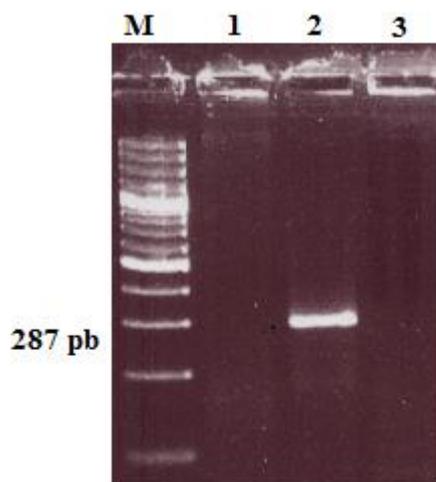


Figura 1. PCR para distemper canino: M: marcadores, 1: muestra MAG 1966-12, 2: vacuna, 3: control negativo.

3.2.2 Implementación PCR anidado para el diagnóstico del Virus de la Encefalitis Equina del Este

En la figura 2, líneas 1, 2 y 4, se observa los resultados positivos de todas las diluciones de cDNA (262 pb), descritas en el Cuadro 6, mediante el protocolo de PCR anidado descrito por Linssen y colaboradores (2000).

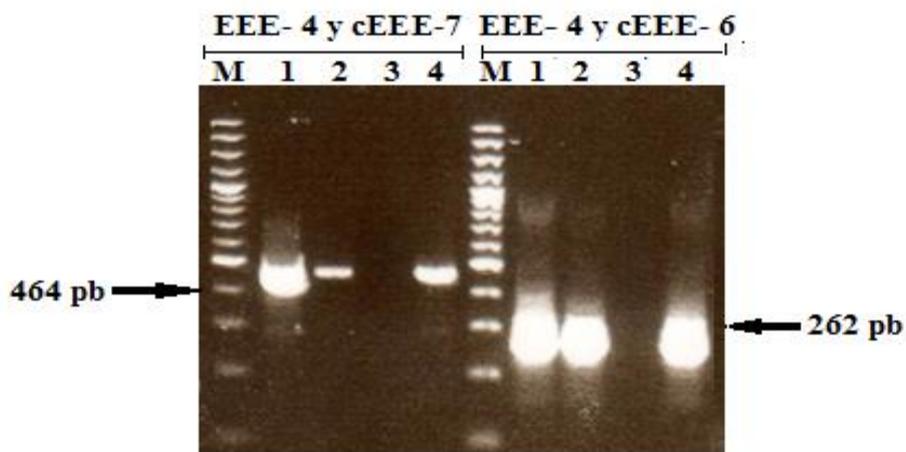


Figura 2. PCR anidado para Encefalitis equina del este: M: marcadores, 1: cDNA puro, 2: cDNA (1: 100), 3: control negativo, 4: cDNA (1: 10).

Cuadro 6: Resultados de PCR de Encefalitis Equina del Este.

<u>Numero de muestra</u>	<u>Dilución de ADN</u>
1	cDNA puro
2	cDNA 1:100
3	Control negativo
4	cDNA 1:10

3.2.3 Implementación del PCR para el diagnóstico de Reovirus Aviaries

Tal como se observa en la línea 1 de la Figura 3, se obtuvo un resultado positivo (532 pb) mediante el protocolo de PCR descrito por Xie y colaboradores (1997).

Para implementar este PCR, se utilizó una vacuna de Reovirus aviar, cepa 1133 de la empresa Intervac.

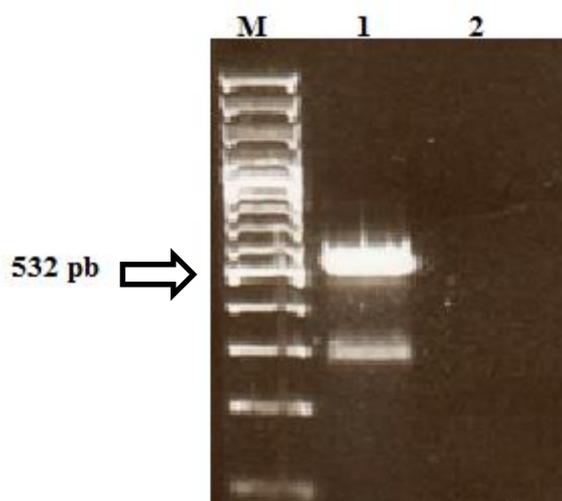


Figura 3. PCR para Reovirus aviar: M: marcadores, 1: vacuna reovirus aviar, 2: control negativo.

4. DISCUSION

El objetivo de la pasantía en el Laboratorio de Virología fue mejorar destrezas y habilidades en diferentes análisis de laboratorio, y por ende el desempeño profesional, al tener conocimiento de la amplia variedad de pruebas disponibles ante la sospecha de una enfermedad viral y así colaborar en la toma de decisiones relacionadas con el control y erradicación de estas enfermedades.

La primera parte de la pasantía consistió en observar lo que se hacía en el laboratorio, su organización, funcionamiento, y desde que llegaba la muestra, hasta que se almacenaba, para luego realizar las pruebas necesarias para su diagnóstico. En ese transcurso se tomó en cuenta el tipo de muestra, la preservación de la misma hasta llegar al laboratorio, el estado en el que se recibe y la temperatura a la que se debía almacenar en el laboratorio de acuerdo al análisis a realizar. Simultáneamente se aprendió a protocolizar e identificar cada una las muestras y la obligación del remitente de llenar adecuadamente el formulario de ingreso.

Al empezar la segunda semana se comenzaron a leer los protocolos laboratoriales y a aplicar dichos procedimientos a las muestras almacenadas o las que iban ingresando al laboratorio, de acuerdo a lo que se ocupara realizar.

4.1 Casuística

4.1.1 Área Aviar

De acuerdo a lo observado en el Cuadro 1, se logra rescatar que el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) autorizó como único laboratorio de diagnóstico al Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria (LVEMV) en el marco del Programa Avícola Nacional, para realizar vigilancia activa y pasiva del virus de Laringotraqueítis infecciosa aviar e Influenza aviar (en el caso de influenza aviar, la vigilancia la comparte con el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE) (OIE, 2008; SENASA, 2010).

En Costa Rica no ha habido reportes de influenza aviar, y la enfermedad de Newcastle ya había sido erradicada de nuestro país, pero se realizan análisis de laboratorio cada cierto tiempo, o cuando se presenta sintomatología en las aves, para confirmar que no estén enfermas. En el caso de bronquitis infecciosa aviar y *Mycoplasma gallisepticum*, se realiza estrictamente la vigilancia activa (SENASA, 2012). Los agentes mencionados anteriormente son de reporte obligatorio, y los laboratorios que se utilizan para el diagnóstico, son el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria y LANASEVE (SENASA, 2012).

Para confirmar que no existan virus de campo, el análisis que más se utiliza es el ELISA indirecto, ya que es rápido, sensible y específico (Dinter, 1989; MacLachlan & Dubovi, 2011).

4.1.2 Área Bovinos

De acuerdo con lo descrito en el Cuadro 2, se logra rescatar que en el caso de leucosis viral bovina, además de ser de reporte obligatorio ante el SENASA, el propósito del muestreo de los sueros analizados en su gran mayoría (92%) son para exportaciones o diagnóstico en general, y el 8% restante es para saneamiento (SENASA, 2012). Por lo tanto los análisis se realizan tanto como

requisito para la comercialización de animales como por voluntad de los ganaderos y veterinarios.

En el caso de rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina, los países importadores generalmente exigen certificados de salud que contemplar descartar infecciones con HVB-1 y VDVB en los animales comercializados. Estos virus también son de reporte obligatorio ante el SENASA (Deregt, 1998).

Los análisis serológicos como el ELISA y la seroneutralización en muchos países constituyen la base de políticas acertadas y eficaces de erradicación de enfermedades (OIE, 2012) y constituyen de las técnicas más frecuentemente empleadas por el LVEMV.

4.1.3 Área Porcinos

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino es una enfermedad de los cerdos que es de interés sanitario y comercial (Rojas, 2013). El SENASA, como autoridad competente requiere que las pruebas de laboratorio realizadas y los resultados que se emitan, cuenten con carácter oficial para su reconocimiento por parte de las autoridades competentes de otros países (Rojas, 2013).

Se hacen análisis laboratoriales toda vez que diversos países, en su condición de socios comerciales, requieren una certificación de laboratorio donde se garantice de que los cerdos a exportar a dichos destinos por parte de Costa Rica, se encuentren libres de dicha enfermedad (Rojas, 2013), también en aquellos casos en que productores nacionales importen animales vivos como pie de cría.

El diagnóstico serológico es fácil de realizar y presenta una adecuada especificidad y sensibilidad, especialmente a nivel de rebaño (OIE, 2012). La principal ventaja de los métodos serológicos; dentro de los cuales está el ELISA, es el manejo rápido de gran número de muestras (OIE, 2012).

4.1.4 Área Felinos

De acuerdo con la información presentada en el Cuadro 3, se infiere que las pruebas de inmunocromatografía son de fácil acceso y económicas, es por esto que tanto veterinarios como propietarios de mascotas las prefieren sobre

otras pruebas laboratoriales. Son pruebas que detectan anticuerpos o antígenos en la sangre o suero del gato (Gerardi & Hernández, 1998). Según Cornell University College of Veterinary Medicine (2001), esta prueba la realizan la mayoría de los laboratorios veterinarios de muchos países, tanto universitarios como comerciales, e incluso está disponible en un kit que se utiliza en clínicas veterinarias privadas.

Los análisis laboratoriales que más se realizaron fueron los de leucemia e inmunodeficiencia felina, según Cornell University College of Veterinary Medicine (2001), esto es porque los kits comerciales de inmunocromatografía que se fabrican, permiten analizar a ambos agentes a la vez, y por esta característica los propietarios demandan más este tipo de análisis.

La diferencia entre la medicina de las especies productivas y las mascotas tales como los felinos, radica en que los últimos son llevados al veterinario por los propietarios debido al interés personal de mantener la salud de su mascota, mientras que en las especies productivas se trata más de beneficios económicos y comerciales (Kahn, 2007).

4.1.5 Área caprinos

El SENASA a través del Programa Nacional de Salud en Rumiantes Menores, estableció estrategias con posibilidades de expandir el mercado a nivel de la región; además de realizar actividades técnicas, de prevención, control y vigilancia epidemiológica de las enfermedades de declaración obligatoria (tal como la Artritis Encefalitis Caprina) y de interés económico de acuerdo con las exigencias del mercado nacional por medio de sus muchos laboratorios oficializados (SENASA, 2013). Entre los programas de control y prevención instaurados por el SENASA se encuentra el diagnóstico serológico y sacrificio de animales seropositivos (Dolz et al., 2009).

El ELISA es una técnica económica, conveniente y cuantitativa para el análisis a gran escala, ya que es fiable para demostrar anticuerpos frente a lentivirus de pequeños rumiantes (OIE, 2008).

4.1.6 Área equinos

De la información presentada en el cuadro 4 se desprende que los exámenes para diagnosticar infecciones con el virus de la anemia infecciosa equina tienen una gran demanda. Esto se explica porque para la participación de equinos en ferias, exposiciones y competencias o bien, con fines reproductivos, es necesario portar el certificado que los acredite como negativos a AIE. Este certificado puede ser emitido por el Laboratorio del SENASA (LANASEVE) u alguno otro particular acreditado por el MAG. Existen varios laboratorios privados autorizados (SENASA, 2012).

La prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID) además de ser prescrita para el comercio internacional y oficializada por el SENASA, es una prueba precisa y fiable para la detección de la AIE en los caballos (OIE, 2013).

El diagnóstico de las Encefalitis Equinas Venezolana (EEV), Este (EEE), Oeste (EEO) y Fiebre del Nilo Occidental (FNO) se realiza en el LVEMV de la Universidad Nacional (SENASA, 2012) mediante ELISA de captura de IgM en equinos con sintomatología neurológica en el marco de proyectos de investigación financiados por CONARE.

4.1.7 Área caninos

De acuerdo con los datos presentados en el cuadro 5, se desprende que los análisis para diagnosticar Distemper Canino y la preparación de vacunas autólogas para el tratamiento de la papilomatosis representan la principal demanda de los usuarios del laboratorio que remiten muestras de origen canino.

El Distemper es una de las enfermedades infectocontagiosas caninas más conocidas por los médicos veterinarios, por lo tanto cuando un animal no está vacunado, presenta mucosidad nasal y/ o síntomas neurológicos, es una de las primeras enfermedades virales en las que piensan (Appel & Summers, 1999).

Existen numerosas pruebas para el diagnóstico del Distemper de acuerdo a diferentes variables, como la historia previa vacunal del animal, el estado evolutivo de la enfermedad, la presencia de signos neurológicos, el acceso a laboratorios de referencia que cuenten con la tecnología adecuada y la capacidad económica del propietario para afrontar pruebas onerosas. Dentro de los análisis

favoritos por los propietarios se encuentra la inmunocromatografía, ya que existen estas pruebas en casi todas las clínicas veterinarias, y son una prueba eficaz y rápida que detecta antígenos específicos; tiene una especificidad del 100% y una sensibilidad del 98,6% (Aralí et al. 2009).

En cuanto al Papilomavirus se puede decir que los propietarios están solicitando con mayor frecuencia la autovacuna como tratamiento, ya que parece ser muy eficaz para combatir los tumores. La misma desarrolla inmunidad a las pocas semanas (Kahn, 2007).

4.1.8 Otras técnicas realizadas

La Tripsinización es una técnica utilizada para el mantenimiento de líneas celulares (Herrero et al., 2004). La técnica utiliza métodos enzimáticos, químicos o mecánicos para disociar tejidos y preparar cultivos primarios (Herrero et al., 2004). En el LVEMV de la Universidad Nacional la técnica de tripsinización se emplea rutinariamente, al menos una vez por semana, para la preparación y el mantenimiento de líneas celulares y cultivos primarios o bien para disponer de células en suspensión empleadas en los procedimientos de titulación viral y seroneutralización entre otros.

La única vacuna a la que se le realizó titulación fue a una de la especie aviar (Newcastle); el virus se incubó en huevos embrionados.

Los biológicos a virus vivo son imprescindibles para el mantenimiento de la salud de los animales y el funcionamiento satisfactorio de los programas de sanidad animal. Es de mucha importancia estar seguros de su administración fiable, que sean vacunas puras, inocuas, potentes y eficaces. La inmunización de los animales con vacunas de buena calidad es el principal medio de control de muchas enfermedades animales. En otros casos, las vacunas se emplean conjuntamente con el control nacional de las enfermedades o de los programas de erradicación (OIE, 2008).

La titulación se llevó a cabo con el propósito de verificar la calidad del biológico.

4.2 Implementación de protocolos

Se logró implementar con éxito los protocolos de Distemper canino, Encefalitis Equina del Este y Reovirus aviar mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando como base protocolos descritos por Frisk (1999), Linssen et al., (2000) y Xie et al., (1997), respectivamente.

4.2.1 Implementación del PCR para el diagnóstico del virus del Distemper canino

Se logró implementar con éxito el protocolo descrito por Frisk (1999) cuyo producto fue de 287 pb tal como se presentó en la Figura 1.

4.2.2 Implementación PCR anidado para el diagnóstico del Virus de la Encefalitis Equina del Este

Se logró implementar con éxito el protocolo descrito por Linssen et al. (2000), donde los primeros productos de PCR para el virus de la Encefalitis Equina del Este utilizando los primers EEE- 4 y cEEE- 7 fueron de 464 pb; y los productos del PCR anidado utilizando los primers EEE- 4 y cEEE- 6 fueron de 262 pb, tal como se observó en la Figura 2, donde se presentaron las muestras utilizadas para esta implementación.

4.2.3 Implementación del PCR para el diagnóstico de Reovirus Aviaries

Se logró implementar con éxito el protocolo descrito por Xie et al. (1997) cuyo producto fue de 532 pb tal como se observó en la Figura 3.

Los reovirus aviaries son frecuentes entre las aves de corral. Aunque la infección suele estar presente sin la enfermedad, los reovirus en ocasiones pueden estar involucrados en varios síndromes de enfermedades de las cuales la artritis viral/ tenosinovitis (cepa 1133) en los pollos es el más importante, sobre todo en las razas de pollos de engorde (Jons, 2000).

5. CONCLUSIONES

- 5.1. Se participó en 2855 análisis de muestras, lo que supera los 2000 análisis que se tenían como objetivo durante la pasantía; además de participar en la recepción y el montaje de los mismos; esto contribuyó con el desarrollo de destrezas y habilidades que esto conlleva.
- 5.2. Se logró mayor eficiencia al desarrollar las actividades cotidianas de laboratorio, así como entender su metodología, mediante la práctica continua de las mismas. Esto mejoró la optimización de la dinámica de trabajo en el laboratorio.
- 5.3. El realizar la pasantía en el laboratorio, permitió ver otras áreas de interés como complemento a los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera y que pueden representar áreas a desempeñar y contribuir con la sociedad.
- 5.4. El ejercicio del trabajo en el laboratorio permite comprender la importancia del mismo, en particular el impacto que tienen los resultados de los análisis sobre la toma de decisiones del médico veterinario dedicado a la clínica y medicina preventiva tanto a nivel individual como colectivo.
- 5.5. Gran parte de las técnicas utilizadas para diagnóstico se basaron en pruebas serológicas como el ELISA.
- 5.6. Al participar en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas, como la implementación del PCR para Distemper canino, Encefalitis Equina del Este, y Reovirus aviar, se aprendió como aplicar la técnica del protocolo básico para este, además de ver la importancia que esta tiene en el ámbito del diagnóstico.

6. RECOMENDACIONES

- 6.1. Instar a la EMV de la UNA a que se utilice la casuística que presenta el laboratorio, como base para el desarrollo de futuras investigaciones, ya sea para trabajos de los estudiantes o de los particulares.
- 6.2. Motivar a los estudiantes a que realicen sus trabajos finales de graduación en el área de laboratorio ya que dicha experiencia es muy importante para aprender a dar soluciones a los diferentes problemas que aquejan a la población (humana y animal).
- 6.3. Adicionar valor a la bitácora en futuras pasantías, ya que esto demuestra la labor real que el pasante realiza diariamente.
- 6.4. Para los estudiantes de la EMV de la UNA, considerar que el área de laboratorio es una buena opción de trabajo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aralí, R., V. Martínez, F. Díaz, C. Coronel, S. Gómez & L. Centeno. 2009. Evaluación de la utilidad de la inmunocromatografía. *Rev. Biomédica*. 29:1-2.
- Appel, J. & B. A. Summers. 1999. *Distemper canino: estado actual*. Baker Institute for Animal Health, New York, USA.
- Cornell University College of Veterinary Medicine. 2001. Virus de la inmunodeficiencia felina [en línea]. Cornell feline health center, New York, USA. www.veterinaria.org (consulta: 10 en. 2015).
- Deregt, D. 1998. Rinotraqueítis infecciosas bovina y diarrea viral bovina: repercusiones en la salud animal y el comercio internacional. [en línea]. OIE, Lethbridge, Canadá. <http://www.oie.int> (Consulta: 21 Abr. 2015).
- Dinter, Z. 1989. *Diagnostic virology*. Biomedicum, Uppsala, SE.
- Dolz, G., D. Fallas, C. Jiménez, D. Montero, J. Prendas & J. Romero. 2009. Epidemiología de la artritis encefalitis caprina en hatos caprinos lecheros de Costa Rica. *Cienc. Vet*. 27: 57 -70.
- Dwight, C., N. Hirsh, N. J. MacLachlan & R. L. Walker. 2004. *Veterinary Microbiology*. 2nd. ed. Blackwell, Iowa, USA.
- Frisk, A. L. 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol*. 37: 3634- 3643.
- Gerardi, G. & J. Hernández. 1998. Leucemia felina. *Med. Vet*. 30(1): 5-12.
- Herrero, L., R. Ávila, L. Hun & E. Corrales. 2004. *Procedimientos en virología médica*. Universidad de Costa Rica, C.R.
- Jiménez, C. 2011. *Informe de labores: programa hospital veterinario*. Universidad Nacional, Heredia, C.R.
- Jons, R. 2000. Avian reovirus infections. *Rev. Sci. Tech*. 19 (2): 614- 625.
- Kahn, C, (ed.). 2007. *Manual Merck de veterinaria*. 6 th. ed. Merck & CO, Nueva York, USA.
- Linssen, B., R. Kinney, P. Aguilar, K. Russell, D. Watts, O. Kadden & M. Pfeffer. 2000. Development of reverse transcription-PCR assays specific for detection of equine Viruses. *J. Clin. Microbiol*. 38: 1527- 1535.

- MacLachlan, N. J & E. J. Dubovi, (eds.). 2011. Fenner's veterinary virology. 4th. ed. Elsevier, California, USA.
- Meyer, D.J. & J.W. Harvey. 1998. Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis. 2nd. ed. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Murrell, M. 2006. Buenas prácticas de laboratorio. Universidad Nacional, C. R.
- OIE (Office International des Epizooties; World Organization for animal health). 1996. Sampling methods. Manual of Standards for Diagnostic Tests and vaccines. París, Francia.
- OIE (Office International des Epizooties; World Organization for animal health). 2004. Manual of Standards for Diagnostic Tests and vaccines. París, Francia.
- OIE (Office International des Epizooties; World Organization for animal health). 2008. Manual of Standards for Diagnostic Tests and vaccines. París, Francia.
- OIE (Office International des Epizooties; World Organization for animal health). 2012. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris, France.
- OIE (Office International des Epizooties; World Organization for animal health). 2013. Manual of Standards for Diagnostic Tests and vaccines. París, Francia.
- Pritchard, G.C, M. Banks & R.E. Vernon. 2003. Subclinical breakdown with infectious bovine rhinotracheitis virus infection in dairy herd of high health status. Vet. Rec. 153, 113- 117.
- Quinn, P.J., B.K. Markey, M.E. Carter & G.R. Carter. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Mosby, London, USA.
- Revista de Difusion de Tecnología Agrícola y Pesquera. 1985. Enfermedades infecciosas en el Ganado bovino [en línea]: prevención y control. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Bolivia, Venezuela. <http://sian.inia.gob.ve> (consulta: 04 Marz. 2015).
- Rojas- Hidalgo, G. 2013. Agricultura y ganadería. La Gaceta. Ene. 09: 17.
- SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal). 2010. PN- AVI- MC- PV Protocolo vigilancia [en línea]. Dirección de Programación Sanitaria, Costa Rica. www.senasa.go.cr (consulta: 03 Mar. 2015).

- SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal). 2012. Informe sobre la situación sanitaria de Costa Rica [en línea]. Gestión del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la Salud Animal de Costa Rica. www.senasa.go.cr (consulta: 09 Mar. 2015).
- SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal). 2013. Programa nacional de salud en rumiantes menores [en línea]. www.senasa.go.cr (consulta: 14 Mar. 2015).
- SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal). 2015. Programa de Enfermedades de las Aves y Animales de Granja [en línea]. Dirección de Programación Sanitaria, Argentina. <http://www.senasa.gov.ar> (Consulta: 24 Feb. 2015).
- Swayne, D. E., J.R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson & W. M. Reed (eds.). 1998. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4th. ed. The American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA.
- Wieggers, A. 1996. Good laboratory practice, quality control, and quality assurance. p. 4. *In* OIE (Office International des Epizooties; World Organization for animal health), (ed.). Manual of standards for diagnostic test and vaccines. OIE Standards Commission, France.
- Xie, Z., A. A. Fadl, T. Girshick & M. L. Khan. 1997. Amplification of avian reovirus RNA using the reverse transcriptase- polymerase chain reaction. American Association of Avian Pathologist. 41: 654- 6