



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

## MANUAL DE PRÁCTICAS PARA EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA MÉDICA

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**  
**P R E S E N T A :**  
**ALMA SUSANA GARCÍA BARRÓN**

ASESORA :

**M EN C. MARÍA GUADALUPE AVILÉS ROBLES**

COASESORA:

**QFB. LETICIA CUBILLO CARRILLO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE



DEPARTAMENTO DE  
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos  
comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Manual de Prácticas para el laboratorio de Virología Médica.

que presenta la pasante: Alma Susana García Barrón  
con número de cuenta: 30034651-6 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en  
el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de mayo de 2009.

PRESIDENTE M.C. Andrea A. Becerril Osnaya

VOCAL Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

SECRETARIO M.C. Ma. Guadalupe Avilés Robles

PRIMER SUPLENTE QFB. Guadalupe Hernández Torres

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez

## AGRADECIMIENTOS

*Mamá, te agradezco que con todos tus esfuerzos me hayas demostrado que debo luchar para alcanzar mis objetivos, que es mi obligación levantarme las veces que sea necesario y nunca rendirme, porque no hay mejor enseñanza que el ejemplo.*

*Bianca, Ángeles, a ustedes hermanitas les doy gracias por el simple hecho de existir a mi lado; son uno de mis mayores motivos para salir adelante, sé que no estoy sola y que ustedes encontrarán en mí un apoyo para el cual debo estar preparada, por ustedes siempre me superaré para que cuando sea su turno les pueda ayudar para lleguen mucho más lejos que yo.*

*A toda mi familia, gracias por apoyarme siempre que lo necesito, en especial a tí **Abue**, que nunca dejaste de creer en mí.*

*Paty, Irwin y toda la familia Morales, gracias por estar conmigo en momentos agradables y en los menos agradables también, solo tengo que decirles que si los conocí es por algo grandioso, se que ustedes lo entenderán.*

*Gracias Juan José (mi Choco) por darme la oportunidad de conocerte, pues en tí encontré a una persona admirable y te agradezco aún más que me permitas compartir estos momentos inolvidables contigo y deseo que sea por mucho más tiempo. Te amo.*

*A todos mis amigos Cinthya, Miriam, Rocío, Fer, Juan Carlos, Viny, Ricardo, Charly, Solises, Kike, Pinky, y por supuesto a mis hermanas del fantástico equipo de Tocho QFB 31, gracias por compartir conmigo la presión (que no es poca) y lo más importante por hacer más ligeros y divertidos todos los días que pudimos durante nuestra estancia en FES.*

*No pueden faltar mis excelentes asesoras Guadalupe Avilés y Leticia Cubillo, que me ofrecieron esta oportunidad en el momento preciso y que ahora considero mis amigas.*

*Y finalmente, pero no menos importante, agradezco a todos los buenísimos profesores de la sección de microbiología que además de buenos académicos son muy buenos amigos: Lupita Hernández, David, Jonathan, Andrea, Gerardo, Gaby Fuentes, Don Martín solo por mencionar a algunos. De verdad Gracias.*

## INDICE GENERAL

	Página
<b>Presentación</b>	<b>1</b>
<b>Reglamento general</b>	<b>2</b>
<b>Introducción general</b>	<b>4</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>7</b>
<b>Material requerido para el laboratorio de Virología Médica</b>	<b>8</b>
<b>Calendario de prácticas</b>	<b>9</b>
<b>Práctica No 1. Bioseguridad</b>	
Objetivo	10
Introducción	10
Ejercicios	13
Referencias	14
<b>Práctica No 2. Vías de inoculación</b>	
Objetivo	15
Introducción	15
Material	17
Procedimiento	
Cavidad Alantoidea	18
Cavidad Amniótica	19
Saco Vitelino	20
Membrana Corioalantoidea	21
Resultados	23
Referencias	24
<b>Práctica No 3. Virus de Newcastle</b>	
Objetivo	25
Introducción	25
Material	27
Procedimiento	
Inoculación del virus	28
Cosecha del virus	29
Resultados	30
Referencias	32
<b>Práctica No 4. Viruela Aviar</b>	
Objetivo	33
Introducción	33
Material	35
Procedimiento	36
Resultados	37
Referencias	39

<b>Práctica No 5. Hemaglutinación</b>	
Objetivo	40
Introducción	40
Material	41
Procedimiento	
Obtención de glóbulos rojos	42
Lavado de glóbulos rojos	43
Hemaglutinación	44
Resultados	45
Ejercicios	47
Referencias	49
<b>Práctica No 6. Inhibición de la hemaglutinación</b>	
Objetivo	50
Introducción	50
Material	51
Procedimiento	
Obtención de glóbulos rojos	52
Lavado de glóbulos rojos	52
Inhibición de la hemaglutinación	53
Ejercicios	55
Resultados	56
Referencias	57
<b>Práctica No 7. Lavado de material</b>	
Objetivo	58
Introducción	58
Material	59
Procedimiento	
Preparación del material	60
Esterilización	61
Referencias	62
<b>Práctica No 8. Cultivo celular</b>	
Objetivo	63
Introducción	63
Material	65
Procedimiento	66
Resultados	67
Referencias	69
<b>Práctica No 9. Pase celular</b>	
Objetivo	70
Introducción	70
Material	71
Procedimiento	72
Resultados	73
Referencias	74

<b>Práctica No 10. Infección de cultivo celular</b>	
Objetivo	75
Introducción	75
Material	76
Procedimiento	77
Resultados	78
Referencias	79
<b>Práctica No 11. Congelación de células</b>	
Objetivo	80
Introducción	80
Material	81
Procedimiento	82
Resultados	83
Referencias	84
<b>Anexos</b>	
Anexo no 1. Como realizar un reporte a manera de artículo	85
Anexo no 2. Tratamiento de residuos	
Tabla A. Tratamiento y disposición de residuos en el laboratorio de Virología Médica	87
Resumen de la NOM 087 ECOL-SSAI-2002	88
Anexo no 3. Preparación de medios y reactivos	
Medio de cultivo DMEM	94
Componentes del suero fetal bovino	95
Solución de Alsever	96
Medio 199	96
Bicarbonato de sodio al 7.5%	96
Buffer Hepes	97
Glutamina	97
Penicilina/estreptomicina	97
Solución salina fisiológica	98
PBS 0.1m pH=7.2	98
Anexo no 4. Descongelación de células	99
Anexo no 5. Clasificación de los virus	
DNA-virus	100
RNA-virus	101
Líneas celulares más importantes	102
Referencias	103
<b>Discusión</b>	104
<b>Conclusiones</b>	106
<b>Referencias Generales</b>	107

## PRESENTACIÓN

El manual de prácticas de Virología Médica ha sido elaborado para servir como una guía a estudiantes de licenciatura que por primera vez están en contacto con el campo de la Virología, ya que actualmente no se cuenta con un respaldo actualizado para este laboratorio, lo cual muchas veces impide la comprensión adecuada de los temas.

Para lograr este objetivo se recopiló información bibliográfica, hemerográfica y de páginas confiables de internet, además de contar con el apoyo de profesoras que durante un periodo considerable de tiempo han impartido la materia.

Este manual consta de 11 prácticas, cada una de las cuales cuenta con objetivo, material, procedimiento, referencias y un espacio para anotaciones, ya sean resultados, análisis de resultados y/o conclusiones, según lo amerite.

Las imágenes presentadas en cada práctica están numeradas de la siguiente manera:

- número correspondiente al de la práctica.
- letra en orden sucesivo según aparezca la imagen


También contiene un anexo, en el cual se incluye preparación de reactivos, el tratamiento y disposición de residuos, entre otros.

Además se incluye el reglamento general del laboratorio, el material sugerido para la materia y una hoja de calendarización que puede ser llenada por el alumno y los profesores.

El *Manual de Prácticas para el laboratorio de Virología Médica* fue elaborado en la sección de Microbiología del departamento de Ciencias de la Salud Humana de la F.E.S. Cuautitlán Campo 1. U.N.A.M..



## REGLAMENTO

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO</b> <b>FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN</b> <b>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS</b>	
	<b>REGLAMENTO GENERAL</b> <b>PARA LOS LABORATORIOS</b>	<b>CODIGO: DOC-CB-FESC-</b> <b>DEX-01-00</b> <b>Nº de REVISIÓN:</b>

- 1) Este reglamento aplicará para personal académico, alumnos y laboratoristas.
- 2) Para todo trabajo realizado en el laboratorio deberá utilizarse bata blanca con manga larga.
- 3) La tolerancia para el inicio de la sesión de laboratorio será hasta de 10 minutos a partir de la hora señalada.
- 4) Por seguridad, no deben cerrarse las puertas del laboratorio con llave durante las prácticas.
- 5) En todo momento deberá mostrarse una conducta adecuada en el área de trabajo.
- 6) Queda prohibido en los laboratorios:
  - a) Tirar basura fuera del cesto.
  - b) Ingerir alimentos y/o bebidas.
  - c) Fumar.
  - d) Recibir visitas.
  - e) La entrada a los inter-laboratorios a toda persona ajena a los mismos.
  - f) Realizar reuniones o convivios en los laboratorios.
  - g) Salir del laboratorio en el horario asignado para la sesión experimental.
  - h) Sentarse sobre las mesas de trabajo.
  - i) Mover el mobiliario de su lugar.
  - j) Utilizar las gavetas para guardar material que no corresponda a la asignatura.
- 7) Los residuos peligrosos deben depositarse en los contenedores destinados para tal fin, entendiendo por residuo peligroso: elementos, sustancias, compuestos, desechos o mezclas de ellos que en cualquier estado físico representan un riesgo para el ambiente, la salud o los recursos naturales, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas (Art. 3º de la Ley General del Equilibrio y Protección del Ambiente).

- 8) Dentro del laboratorio no se permite el uso de teléfonos celulares, reproductores de sonido o cualquier medio electrónico de entretenimiento.
- 9) El acceso al laboratorio se permitirá únicamente cuando esté presente un profesor.
- 10) El uso del laboratorio para trabajo extraordinario, deberá programarse con el responsable del laboratorio en un horario que no interfiera con aquel destinado para el desarrollo de las prácticas.
- 11) Para solicitar material y equipo, es requisito indispensable que el alumno llene debidamente el vale de material (FPE-CB-DEX-01-09) y lo entregue a la persona responsable, dejando como depósito la credencial vigente de la UNAM.
- 12) El alumno deberá revisar el material y/o equipo al momento de recibirlo indicando cualquier anomalía (faltante o material dañado) y será devuelto en las condiciones en que se recibió, de no hacerlo, se hará acreedor a las sanciones establecidas en cada laboratorio.
- 13) Es obligación de todos mantener limpio y ordenado el lugar de trabajo y todo el laboratorio.

## INTRODUCCIÓN A LA VIROLOGÍA MÉDICA

El descubrimiento de las bacterias como causantes de enfermedad y su aislamiento en medios de cultivo, en el siglo XIX, son hechos importantes en la historia de la medicina. Los investigadores comenzaron a ver tras cada enfermedad un microorganismo causal, y muchas veces tuvieron éxito.

Sin embargo, en algunas enfermedades no se lograba identificar el agente causal, a pesar de esto, la gente tenía costumbres o métodos para evitar las enfermedades, un ejemplo se observó en China, donde las madres protegían a sus hijos de contraer viruela al inocularlos con costras de enfermos, pues se daban cuenta que al hacerlo ya no enfermaban.

Basándose en estos hechos, el médico inglés **Edward Jenner**, (1798) observó que las personas en contacto con ganado vacuno, a veces resultaba infectados por una forma de viruela muy benigna (la persona no moría) y éstas personas luego no padecían la viruela humana. Entonces, comenzó a inocular a las personas con material procedente de pústulas de vacas enfermas de viruela vacuna, dando paso a la **vacunación**.

Al no encontrar agente causal para estas enfermedades, los científicos comenzaron a buscar nuevas alternativas para descubrirlo.

El descubrimiento de los virus se atribuye a **Ivanowski** (1892) y **Beijerinck** (1898), quienes trabajaban con plantas de tabaco que tenían una enfermedad llamada mosaico (las hojas tienen zonas con diversos colores), e intentaban averiguar el origen. Ellos, hacían extractos con las plantas infectadas, los cuales se hacían pasar por unos filtros con la esperanza de que los agentes causantes del mosaico quedaran retenidos en él, como habían hecho con microorganismos conocidos hasta entonces (bacterias, hongos, protozoos). Pero se comprobó que el agente pasaba los filtros pues al inocular el filtrado en plantas sanas, éstas enfermaban.

Estos autores dedujeron que el mosaico del tabaco (VMT) estaba producido por un agente muy pequeño que atravesaban los filtros y los denominaron **virus filtrables** (proviene de veneno).

Casi al mismo tiempo en 1898, **Loefler** y **Frosh**, en sus estudios sobre la fiebre aftosa llegaron a la conclusión de que este agente infeccioso probablemente no era una bacteria ni una toxina y que provocaba la muerte de los animales infectados, a partir de este momento se descubrieron más enfermedades causadas por los microorganismos desconocidos.

Fue hasta el año 1939, aproximadamente, que se logró observar al elusivo agente causal de la enfermedad del mosaico del tabaco mediante microscopía electrónica; se descubrió su morfología la cual era distinta a la de las bacterias y además eran resistentes a los tratamientos físicos y químicos convencionales para eliminarlos.

Desde entonces los virus han representado históricamente un problema muy grave para la salud de los humanos: en 1918 una pandemia de gripe (influenza) ocasionó la muerte de más de 30 millones de personas alrededor del mundo, posteriormente este virus ocasionó epidemias de menor intensidad pero igualmente temidas.

Entre 1957 y 1986 se estima que, sólo en Estados Unidos, los virus de la influenza ocasionaron más de 10 000 muertes. La fama de los virus es merecida, en el caso del SIDA por ejemplo, está asociado a una importante tasa de mortalidad en el mundo, o bien, en el caso de la viruela, que en el pasado provocó miles de muertes.

Como se puede observar la Virología, una de las ramas de la Microbiología encargada del estudio de los virus en general, es muy importante y para el médico clínico, los virus son interesantes en la medida en que puedan ser causantes de enfermedad.

Este interés muy particular es la razón por la cual hoy en día exista la Virología Médica como rama de la Virología General. Sin embargo, es indiscutible que hasta hace poco tiempo esta nueva rama no constituyó un gran avance, pero en la actualidad existen muchos progresos en este campo gracias a la utilización de técnicas de Biología Molecular para el estudio y diagnóstico de los virus tales como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Asssay), Inmunofluorescencia, entre otras.

## **ESTRUCTURA DE LOS VIRUS**

Los virus son partículas infecciosas de menor tamaño, con un diámetro que oscila entre los 18 hasta casi los 300 nm (el tamaño de la mayor parte de los virus es inferior a 200 nm y no pueden visualizarse mediante el microscopio óptico). Se han descrito más de 25 familias víricas que contienen más de 1550 especies de virus, muchas de las cuales se asocian a enfermedad en el ser humano.

### **Ácidos nucleicos virales**

Los virus se caracterizan, por presentar una única especie de ácido nucleico constitutiva que puede ser **DNA o RNA**, monocatenario o bicatenario con estructura de doble hélice.

La mayoría de los virus DNA presentan un genoma bicatenario (doble cadena), con excepción de los parvovirus, constituidos por DNA monocatenario (cadena simple). Además las moléculas de DNA viral pueden ser lineales o circulares.

El RNA de los virus animales es en su gran mayoría de cadena simple, siendo *Reoviridae* y *Birnaviridae* las únicas familias que presentan como genoma RNA bicatenario. En algunos grupos de virus, el RNA genómico está segmentado en varios fragmentos, cuyo número es característico de cada familia.

Además de las características físicas y químicas mencionadas, la *polaridad* o sentido de la cadena de RNA es una propiedad fundamental utilizada para definir los distintos tipos de RNA viral. Se parte de definir como polaridad positiva la secuencia de bases correspondiente al RNAm (RNAmensajero) y polaridad negativa a su secuencia complementaria. Un virus es de

cadena positiva cuando su RNA genómico tiene la polaridad que le permite actuar como RNAm, o sea ser traducido en proteínas, inmediatamente después de haber entrado a la célula.

Por el contrario, en los virus de polaridad negativa el RNA genómico tiene la secuencia complementaria al RNAm viral; por lo tanto, cuando se produce la infección y el RNA del virus entra en la célula debe sintetizar la cadena complementaria que será el RNAm.

Para ello, los virus de polaridad negativa llevan en el virión (partícula viral infecciosa) asociada a su genoma una RNA polimerasa dependiente de RNA, enzima denominada transcriptasa, que efectúa la transcripción del RNAm a partir del ARN genómico.

### **Cápside**

La cápside es una cubierta proteica externa que encierra y protege al genoma viral de la acción de nucleasas y otros factores adversos del medio exterior. Además, en los virus desnudos carentes de envoltura, la cápside es la encargada de establecer a través de alguna de sus proteínas la unión con la célula parasitada por el virus. Así mismo, las proteínas de la cápside contienen los determinantes antigénicos contra los que el sistema inmune del hospedador elaborará la respuesta de anticuerpos en defensa del organismo.

Hay dos tipos básicos de estructura que pueden presentar las cápsides virales:

- **simetría icosaédrica**, observándose el virión al microscopio de forma aproximadamente esférica.
- **simetría helicoidal**, resultando nucleocápsides filamentosas tubulares pero que pueden estar encerradas dentro de una envoltura que confiere a la partícula forma esférica o de bastón.

### **Envoltura**

La envoltura de un virus es una membrana constituida por una doble capa lipídica asociada a glicoproteínas que pueden proyectarse en forma de espículas desde la superficie de la partícula viral hacia el exterior; adquieren su estructura mediante un proceso de brotación a través de alguna membrana celular. Por tal razón, el número de estas proteínas que presentan los virus animales es muy variable.

Las glicoproteínas virales cumplen diversas funciones biológicas durante el ciclo de vida de la partícula viral, siendo esenciales para la infectividad, ya que actúan en:

- adsorción a la célula hospedadora.
- proceso de fusión que permite la entrada de la nucleocápside viral al citoplasma
- brotación, que permite la salida del virus envuelto a partir de la célula infectada.

## **OBJETIVOS GENERALES**

- El Manual de Prácticas de Virología Médica tiene como principal objetivo servir como apoyo para alumnos y profesores, al ofrecer información confiable que fue recopilada y sintetizada a partir de fuentes bibliográficas, hemerográficas y electrónicas para mejorar la comprensión de los temas revisados en el laboratorio de esta materia.
- Ofrecer un documento actualizado, en forma de manual para homogeneizar los procedimientos de las prácticas que se realizan en los laboratorios de Virología Médica de la FES-Cuautitlán Campo 1.

## MATERIAL REQUERIDO PARA EL LABORATORIO

<b>MATERIAL POR EQUIPO</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 Jeringas de 1ml (aguja desmontable)</li> <li>• 2 Jeringas de 10 ml ó 5 ml</li> <li>• 5 Agujas sueltas verdes</li> <li>• 500 ml de alcohol al 70%</li> <li>• 1 L de belzal</li> <li>• Pinzas y tijeras de disección</li> <li>• 5 Lancetas</li> <li>• 5 Gasas estériles</li> <li>• Barniz de uñas de color (espeso)</li> <li>• Perilla o propipeta</li> <li>• 1 Rollo de servitoallas</li> <li>• 1 Carrete de hilo</li> <li>• 1 Barra magnética mediana (1.5 cm)</li> <li>• Masking tape</li> </ul>

<b>MATERIAL INDIVIDUAL</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata blanca manga larga</li> <li>• 1 Lápiz, NO LAPICERO</li> <li>• 6 Pares de guantes</li> <li>• 1 Par de guantes estériles</li> <li>• Encendedor o Cerillos</li> <li>• Jabón líquido antibacterial</li> <li>• Marcador indeleble</li> <li>• 3 Cubrebocas</li> </ul>

<b>MATERIAL POR GRUPO</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 g de bolsas de capacidad de 1 Kg</li> <li>• 500 g de bolsas de camiseta</li> <li>• 20 Pliegos de papel de Estraza</li> <li>• 1 Paquete de 250 g de algodón</li> <li>• 1 Candado con 2 llaves</li> </ul>

## CALENDARIO DE PRÁCTICAS

<b>PRACTICA O ACTIVIDAD</b>	<b>FECHA</b>
Presentación	
<b>01.-</b> Bioseguridad	
<b>02.-</b> Vías de inoculación	
<b>03.-</b> Virus de Newcastle	
<b>04.-</b> Virus de Viruela aviar	
<b>1er EXAMEN PARCIAL</b>	
<b>05.-</b> Hemaglutinación	
<b>06.-</b> Inhibición de la Hemaglutinación	
<b>07.-</b> Lavado de material	
<b>08.-</b> Cultivo celular	
<b>09.-</b> Pase celular	
<b>10.-</b> Infección de cultivo celular	
<b>11.-</b> Congelación de células	
<b>2do EXAMEN PARCIAL</b>	



## PRACTICA 1

### BIOSEGURIDAD

#### **Objetivo:**

Conocer los cuatro niveles de bioseguridad establecidos para laboratorios donde se trabaja con agentes biológicos potencialmente patógenos, mediante la revisión teórica de los procedimientos estandarizados por el CDC (Centers of Disease control and Prevention) y la **NOM-087-ECOL-SSA1-2002** (Norma Oficial Mexicana), de este modo, se podrá identificar el nivel en el que se encuentra el laboratorio de virología médica y se tomarán las medidas necesarias de bioseguridad requeridas.

### INTRODUCCIÓN

Bioseguridad se define como el conjunto de normas a seguir para el adecuado manejo de la biotecnología y sus productos.

El CDC y los Institutos Nacionales de Salud (NIH) han desarrollado procedimientos estandarizados de trabajo para la protección contra peligros biológicos.

Se han establecido 4 Niveles de Bioseguridad (NBS), aunque ya se plantea la posible existencia de un nivel 5 donde serían almacenados aquellos microorganismos diseñados por ingeniería genética y altamente mortales. Cada nivel se basa en el tipo de agente biológico así como la operación adecuada del laboratorio.

En el NBS1 se trabajan agentes que causan un daño mínimo, mientras que en NBS4 se requieren medidas de protección para agentes que producen mayor daño, este laboratorio es mucho más especializado y por lo tanto no se trabajan este tipo de agentes en la docencia.

#### **NBS1**

Este nivel es el más adecuado para la docencia, se trabajan agentes que están identificados en el medio ambiente que se sabe causan enfermedades en adultos y animales.

Algunos agentes son:

- *Bacillus subtilis*
- *Lactobacillus species*
- *Erwinia species*
- *Micrococcus luteus*
- *Staphylococcus albus*
- Virus de la hepatitis canina

**NBS2**

Se trabajan agentes de peligro moderado para el personal de laboratorio y el ambiente, por ejemplo:

- *Staphylococcus aureus*
- *Enterobacteriaceae*
- *Pseudomonas species*
- *Clostridium species*
- *Mycobacterium leprae*
- *Bordetella pertussis*
- *Candida albicans*
- *Cryptococcus neoformans*
- Hepatitis B (HBV)
- Hepatitis C (HCV)
- VIH

**NBS3**

Se debe de trabajar en campanas de flujo laminar (Fig. 1a) ya que este nivel involucra agentes cuya transmisión es principalmente por aerosoles algunos ejemplos son:

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Coxiella burnetti*
- *Francisella tularensis*
- *Coccidioides spp.*
- Virus de la estomatitis vesicular
- Virus de la fiebre amarilla



(1)



(2)

**Fig. 1a. Campana de flujo laminar horizontal (1) y vertical (2). Las campanas de flujo laminar horizontales y verticales nos permiten obtener una zona estéril, para preparación de medios de cultivo, siembras no patógenas, preparación de soluciones hipertónicas, entre otras.**

**NBS4**

En este nivel se trabajan agentes altamente virulentos para el ser humano, se consideran microorganismos exóticos y se transmiten de humano a humano por medio de aerosoles. No existe tratamiento ni profilaxis. Desde 1990 se han descubierto nuevos virus.

Dentro de este nivel se encuentran 7 familias taxonómicas:

- *Arenaviridae*: Virus Junin, Virus de Lassa, Virus Machupo, Virus Sabia, etc.
- *Bunyaviridae*: Hantavirus y Nairovirus como virus de la Fiebre Hemorrágica del Congo-Crimean.
- *Filoviridae*: Ebola, Virus Marbug.
- *Flaviviridae*: Virus de la Encefalitis de Europa central, Virus de la Fiebre Hemorrágica de Omsk, Virus de la Enfermedad del Bosque de Kyasanur, Virus de la Encefalitis Rusa.
- *Herpesviridae*: Herpesvirus 1 Cercopitecín antes conocido como virus del Herpes tipo B.
- *Paramixoviridae*: Virus Nipah, Virus Hendra.
- *Poxviridae*: Viruela mayor.

**EJERCICIOS**

Menciona que medidas de bioseguridad se requieren para cada NBS.

NBS1

---

---

---

---

---

NBS2

---

---

---

---

---

NBS3

---

---

---

---

---

NBS4

---

---

---

---

---

---

## REFERENCIAS

- FLEMING, O. Diane.(2006). **BIOLOGICAL SAFETY: PRINCIPLES AND PRACTICES**. 4ª ed, ASM Press. U.S.A. pp.489-490, 542-543
- LLOP, Hernández, Alina. (2001). **MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICAS**. Tomo II, Edit. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. pp. 19, 20.
- LIBIA, Herrero Uribe. (2004). **PROCEDIMIENTOS EN VIROLOGÍA MÉDICA**. Ed. Univesidad de Costa Rica. México. pp. 3-13

## PRÁCTICA No 2

### VIAS DE INOCULACIÓN

#### **Objetivo:**

Conocer y aplicar correctamente los métodos adecuados para realizar inoculaciones de virus en embriones de pollo, practicando inicialmente con colorantes.

#### **INTRODUCCIÓN**

Debido a que los virus son parásitos intracelulares estrictos, las técnicas que se emplean para su conservación y replicación son más complejas que las utilizadas para bacterias.

Los tres métodos más utilizados para cultivar virus de animales son:

- Inoculación en animales.
- Inoculación en huevos fecundados.
- Inoculación en cultivos de células.

La inoculación en huevos fecundados, se ha utilizado durante más de 50 años y ha sido posible cultivar virus de diversos grupos en distintas cavidades del huevo fecundado (Fig. 2a), o en el propio embrión. Este método es uno de los más valiosos y más empleados ya que se pueden obtener grandes cantidades del agente viral para análisis químicos y estudios de sus propiedades físicas.

Para este fin, el huevo embrionado más utilizado es el de gallina por las siguientes razones:

- Se pueden adquirir con facilidad.
- Son baratos.
- Tienen tamaño adecuado.
- Están relativamente exentos de infecciones y de contaminantes externos.
- No se forman anticuerpos contra el virus.

El crecimiento de un virus en el embrión de pollo puede comprobarse por varios métodos, entre los cuales se encuentran:

- Pruebas cuantitativas de infectividad, tomando muestras de los líquidos extraembrionarios, membranas o del propio embrión.
- Investigando las lesiones.
- Mediante reacciones serológicas.
- Por medio de la reacción de la hemaglutinación.

Los huevos embrionados pueden inocularse por varias vías y la elección de una determinada depende del virus de que se trate así como de sus afinidades o tropismos hísticos.

## Vías de Inoculación

- Cavidad Amniótica: el material inoculado ingresará en el embrión vía bucal y respiratoria, pudiéndose multiplicar en cualquier tejido de éste. El embrión debe ser de 10-14 días de edad.
- Membrana corioalantoidea: usada para virus que producen placas, lesiones herpéticas poxvirus. Los embriones deben ser de 10-12 días de edad.
- Cavidad alantoidea: el virus se difundirá en el fluido e infectará las células ectodérmicas de la membrana. Se utilizan embriones de 10-11 días de edad.
- Saco vitelino: es sumamente adecuada para aislamiento y cultivo de los virus variólicos que producen focos o pústulas fácilmente visibles. Se emplean embriones de 8-12 días de edad.
- Vía intravenosa: la membrana corioalantoidea está irrigada por vasos sanguíneos, y es susceptible de inoculación para casos especiales como virus que ocasionan cambios hematológicos; por ejemplo el virus de la leucemia. Son empleados embriones de 10-15 días.
- Vía intracerebral (embrión): utilizada específicamente para virus que producen alteraciones cerebrales como la rabia o el herpes. Se emplean embriones de 8-14 días.

Por el tipo de virus que utilizaremos en esta práctica, solo emplearemos las cuatro primeras vías (cavidad amniótica, membrana corioalantoidea, cavidad alantoidea y saco vitelino).

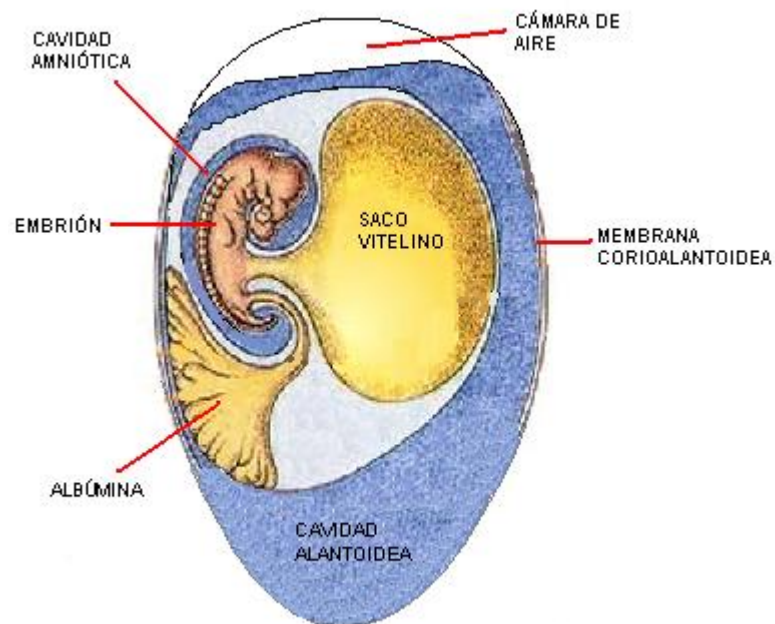


Fig. No 2a. Anatomía del embrión de pollo.

Como criterio indicador de la presencia del virus, se puede tomar la muerte del embrión, o en caso de ser imposible, pueden utilizarse ciertas lesiones como prueba de infección; por ejemplo:

- Hemorragias subcutáneas.
- Congestionamiento de la epidermis.
- Retorcimiento y enanismo del embrión.
- Engrosamiento y fibrosis de la membrana amniótica.
- Disminución del volumen del líquido amniótico.
- Engrosamiento y edema de la membrana corioalantoidea.
- Lesiones pusturales de la membrana corioalantoidea.
- Desarrollo anormal de las plumas.
- Cuerpos de inclusión.

## **MATERIAL**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

- 4 Huevos embrionados de 7-12 días de desarrollo.

### **EQUIPO**

- Ovoscopios.

### **SOLUCIONES**

- Alcohol etílico al 70%.
- Esmalte para uñas.

### **OTROS**

- Colorante.
- Jeringas de tuberculina.
- Agujas calibre 27
- Mecheros.
- Base para mecheros.
- Lápiz.
- Algodón.
- Pinzas de disección.



## PROCEDIMIENTO

### INOCULACIÓN EN CAVIDAD ALANTOIDEA

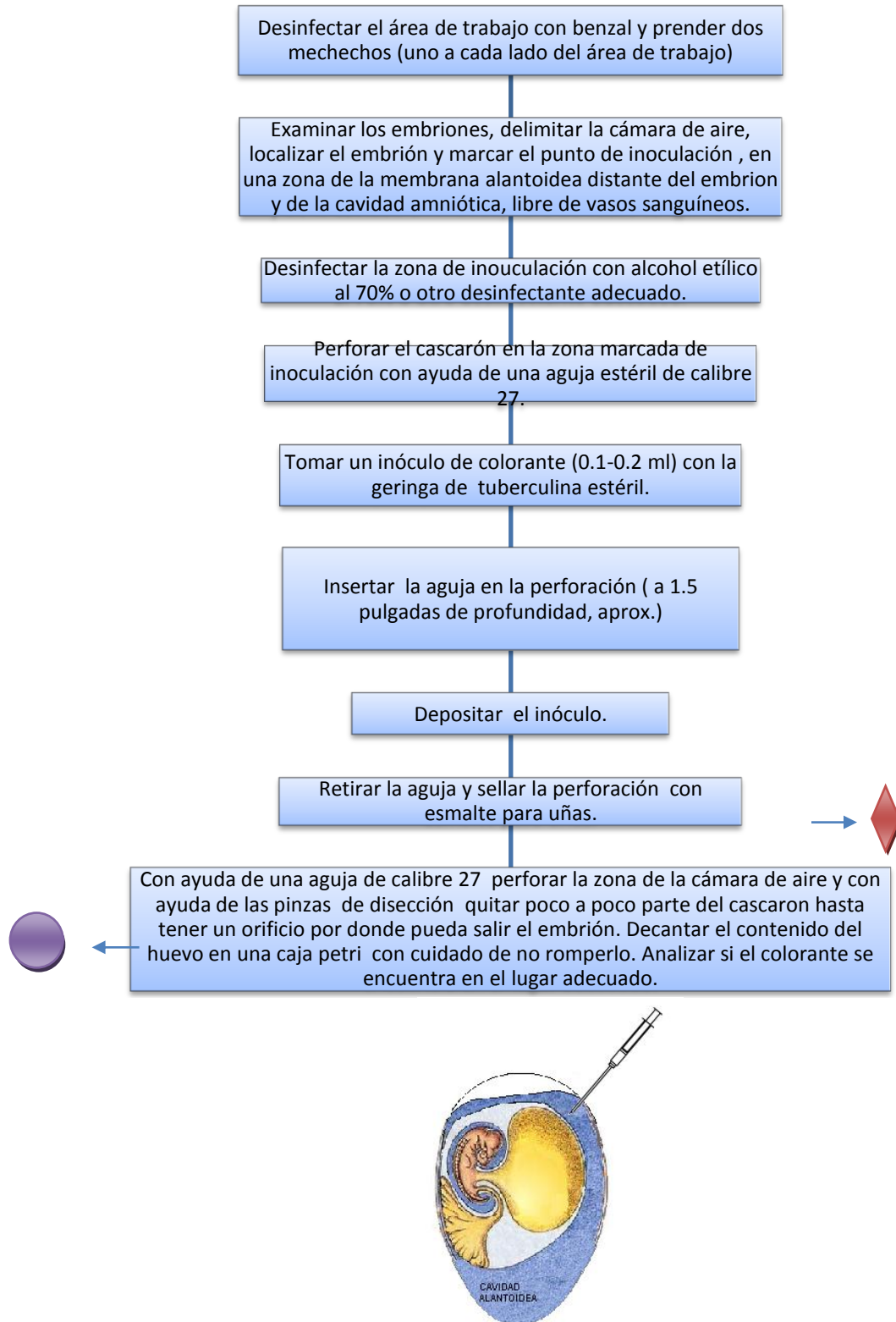


Fig. No 2b. Inoculación en cavidad alantoidea.

## INOCULACIÓN EN CAVIDAD AMNIÓTICA.

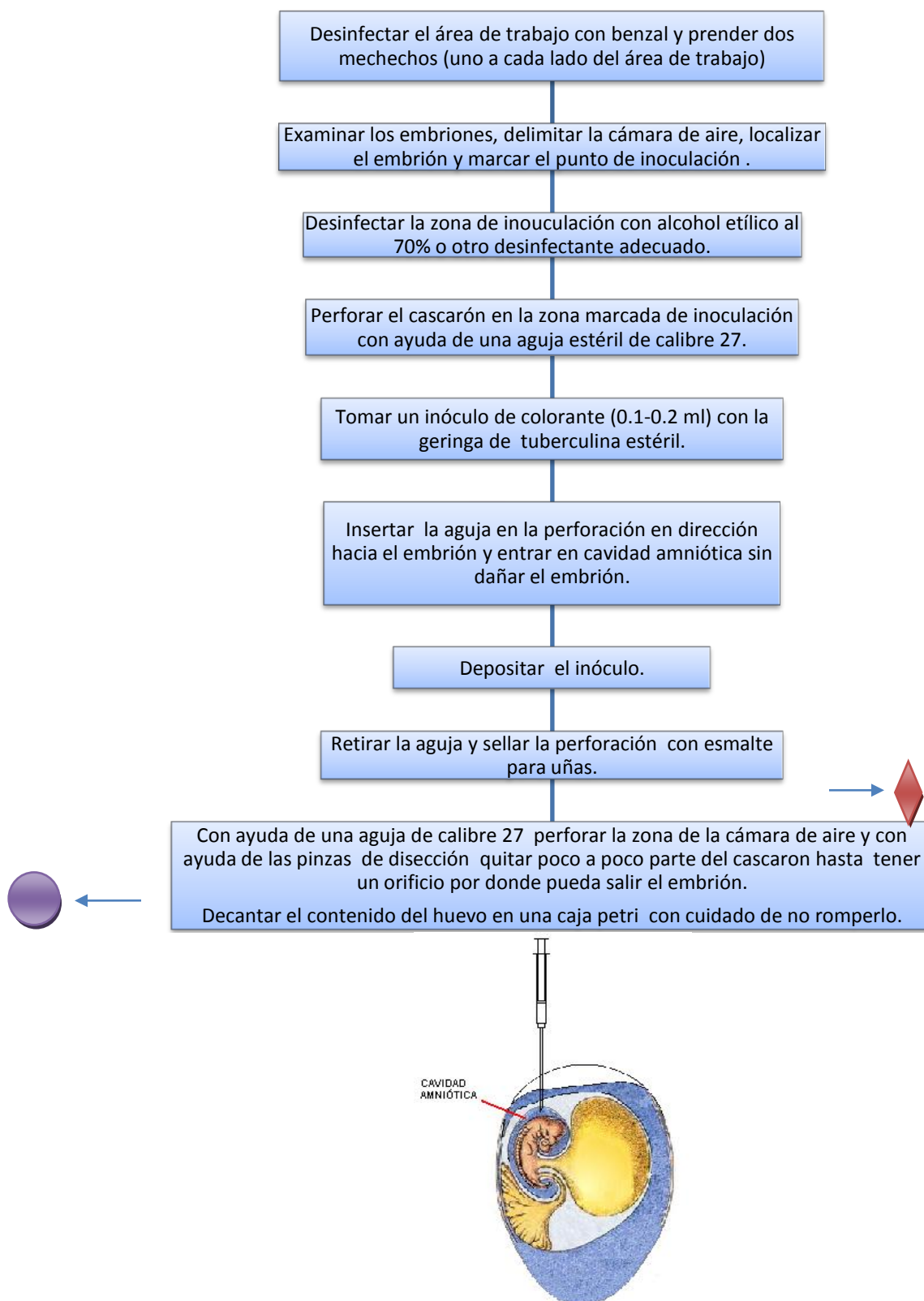


Fig. No 2c. Inoculación en cavidad amniótica.

## INOCULACIÓN EN SACO VITELINO.

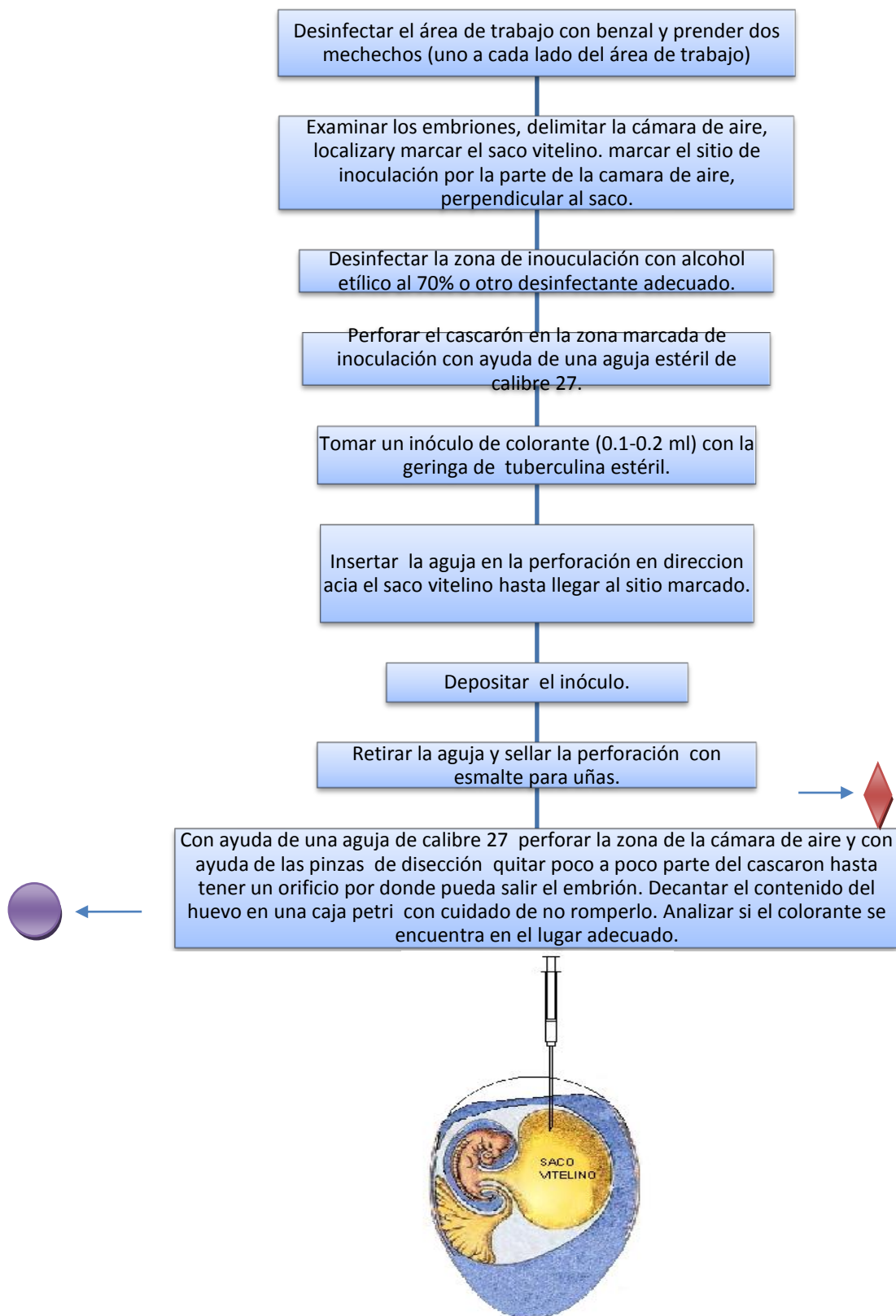
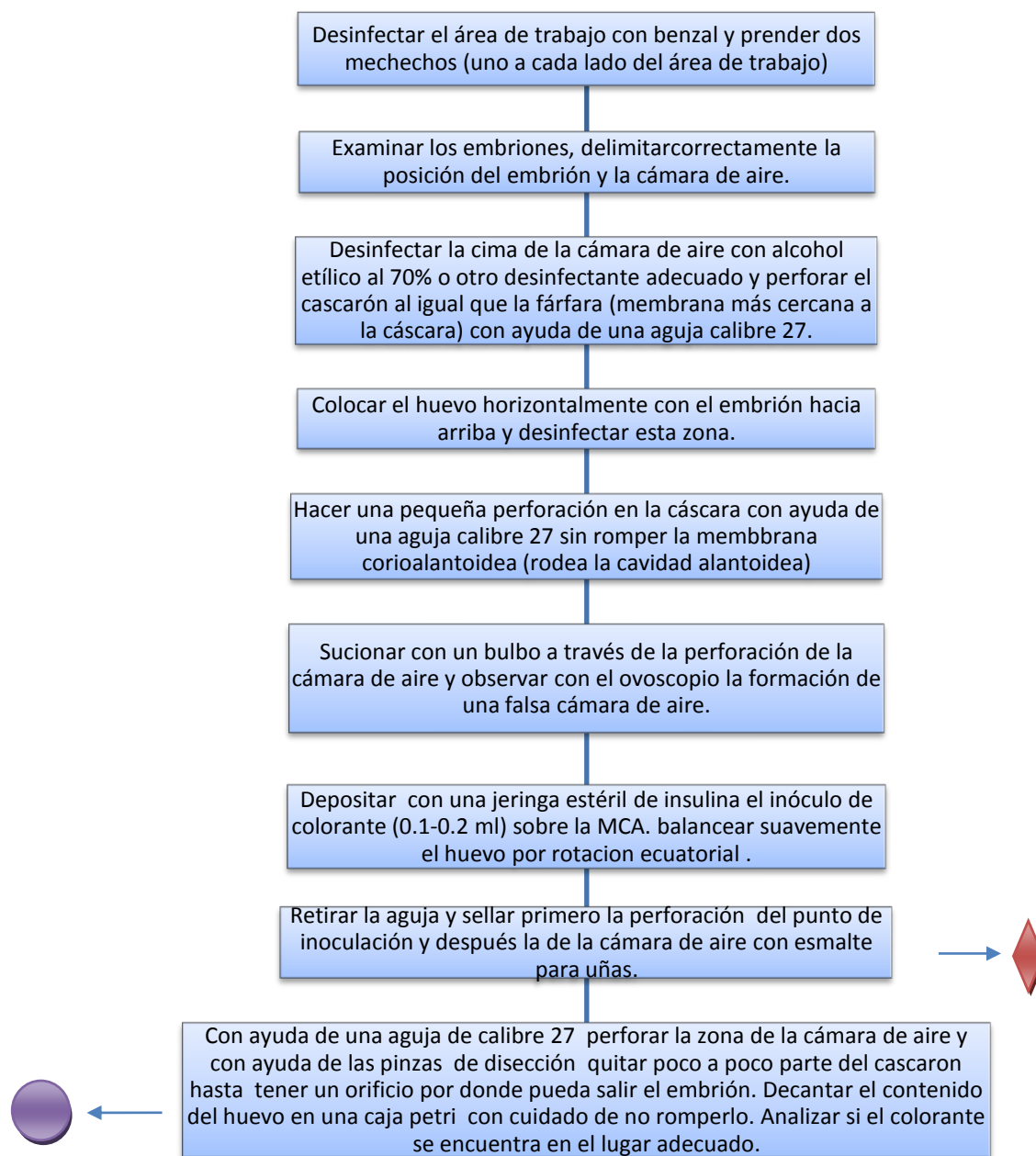


Fig. No 2d. Inoculación en saco vitelino.

## INOCULACIÓN EN MEMBRANA CORIOALANTOIDEA

En este método se crea una cámara de aire artificial para tener la seguridad que todo el inóculo es depositado en la membrana corioalantoidea.



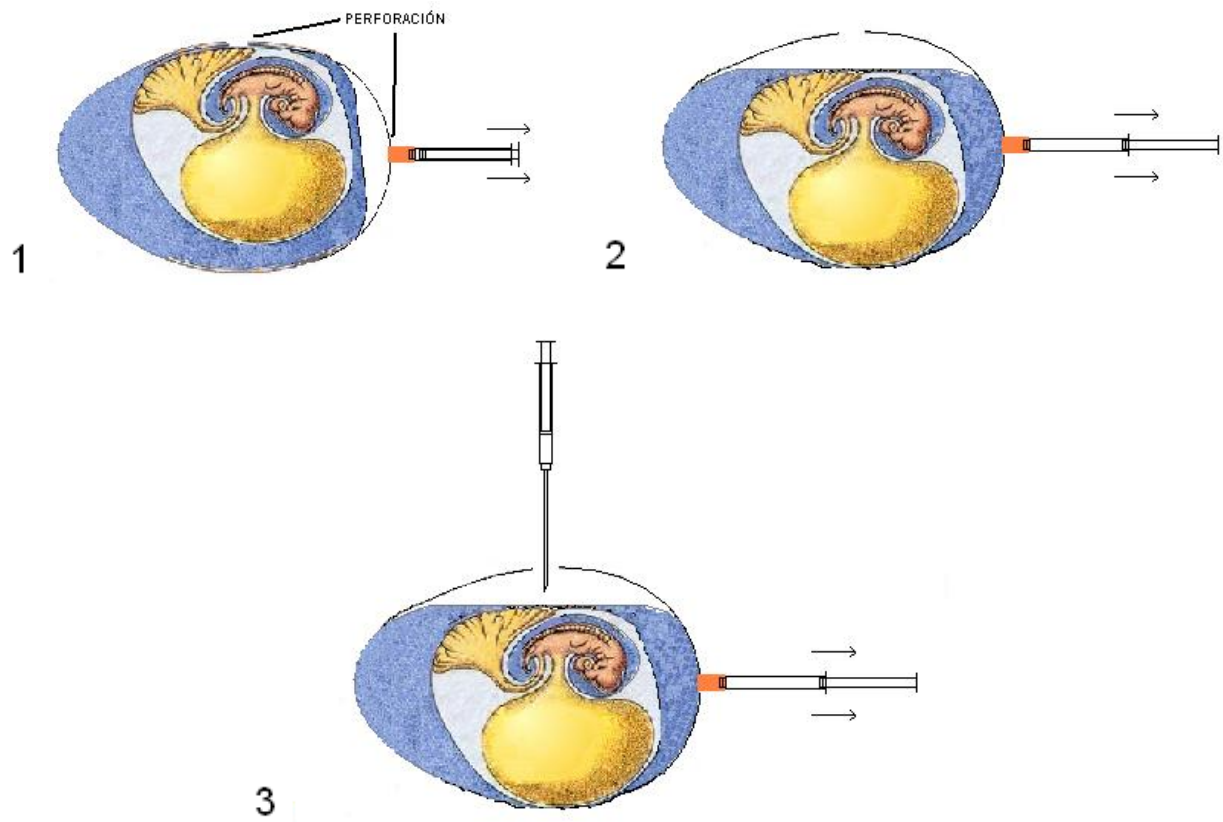


Fig. No 2e. Inoculación en membranas corioalantoidea.



## REFERENCIAS

- BURLESON, Florence G. (1992). **VIROLOGY A LABORATORY MANUAL**. Academic Press, inc. U.S.A. pp.86.
- CUNNINGHAM, Charles. (1971). **VIROLOGÍA PRÁCTICA**. 6a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 57-67.
- LIBIA, Herrero Uribe. (2004). **PROCEDIMIENTOS EN VIROLOGÍA MÉDICA**. Ed. Univesidad de Costa Rica. México. pp. 98-104.
- LLOP, Hernández, Alina. (2001). **MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICAS**. Tomo II, Edit. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. pp. 16.
- MERCHANT, I.A. (1980). **BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA VETERINARIAS**. 3a ed. Ed. Acribia. España. pp. 614-619.
- [www.imbiomed.com](http://www.imbiomed.com)

## PRACTICA 3

### VIRUS DE NEWCASTLE

#### Objetivo:

Inocular el virus de Newcastle utilizando el método propuesto de inoculación en cavidad alantoidea y cosechar el líquido para obtener la partícula viral e identificar los signos de infección que produce en el embrión de pollo.

#### INTRODUCCIÓN

El virus de Newcastle es miembro de la familia *Paramixoviridae* y a su vez a la subfamilia *Paramixovirinae*, género *Rubulavirus*. Este es un virus RNA de cadena negativa.

Es el agente etiológico de la enfermedad altamente infecciosa y algunas veces letal en las aves domésticas y salvajes. Se clasifica dentro de NBS1.

La forma severa de la enfermedad en las aves se presentó por primera vez en Indonesia y Gran Bretaña en 1926. Subsecuentemente, fue detectada en todo el mundo y se describieron formas menos graves.

La enfermedad de Newcastle es altamente infecciosa en pollos, pavos, faisanes, gallina de guinea, loros, cuervos y otros, afectando el sistema respiratorio, gastrointestinal y SNC.

Los síntomas respiratorios y/o nerviosos son:

- Jadeo y tos.
- Alas caídas.
- Arrastre de las patas.
- Cabeza y cuello torcidos.
- Desplazamientos en círculos.
- Depresión, inapetencia.
- Parálisis completa.

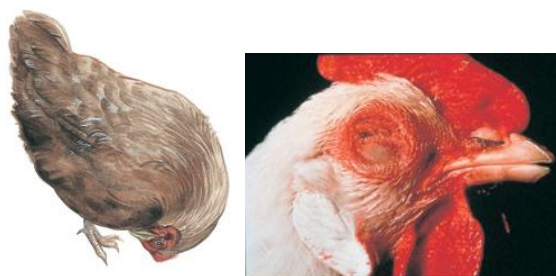


Fig. No 3a. Signos observados en aves infectados con el virus de Newcastle.



Además, se presenta:

- Interrupción parcial o completa de la producción de huevos.
- Huevos deformados, de cáscara rugosa y fina, que contienen albúmina acuosa.
- Diarrea verde acuosa.
- tejidos hinchados en torno a los ojos y el cuello.

El diagnóstico se basa en la identificación de los signos clínicos y en los análisis de laboratorio.

Los análisis de laboratorio se basan en son:

- Identificación del agente: actividad de la hemoaglutinación, inhibición de la hemoaglutinación o pruebas serológicas ( por ejemplo ELISA).
- Evaluación de la patogenicidad: índice de patogenicidad intracerebral en pollitos de 1 día; índice de patogenicidad intravenoso en pollos de 6 semanas.

Esta enfermedad no tiene tratamiento, solamente se realiza prevención con vacunas que actualmente se puede encontrar en forma liofilizada (desechada a alto vacío y muy bajas temperaturas) de partículas virales atenuadas.

La primera manifestación de la enfermedad en humanos fue descrita por Burnet en los trabajadores de un laboratorio.

Clínicamente en el ser humano la infección por virus de Newcastle se manifiesta como conjuntivitis superficial, (aunque en algunos casos puede llegar a ser hemorrágica), con presencia de exudado y sin pseudomembranas. Raramente se puede presentar un poco de fiebre, pero es común la cefalea. No se transmite de persona a persona. Las infecciones se han presentado por cepas salvajes y cepas vacunales.

El periodo de incubación del virus de Newcastle puede ser de 1-4 días.

Se puede inactivar el virus al tratarlo con éter etílico, formalina y empleando luz UV o sometiéndolo a 56°C de temperatura.

El virus aglutina glóbulos rojos de varias especies de aves y mamíferos, los más empleados son eritrocitos de pollo, puerco de guinea y glóbulos rojos de humano tipo O.

## **MATERIAL**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

- 2 embriones de pollo de 9 días de desarrollo
- 1 vacuna de virus de Newcastle

### **EQUIPO**

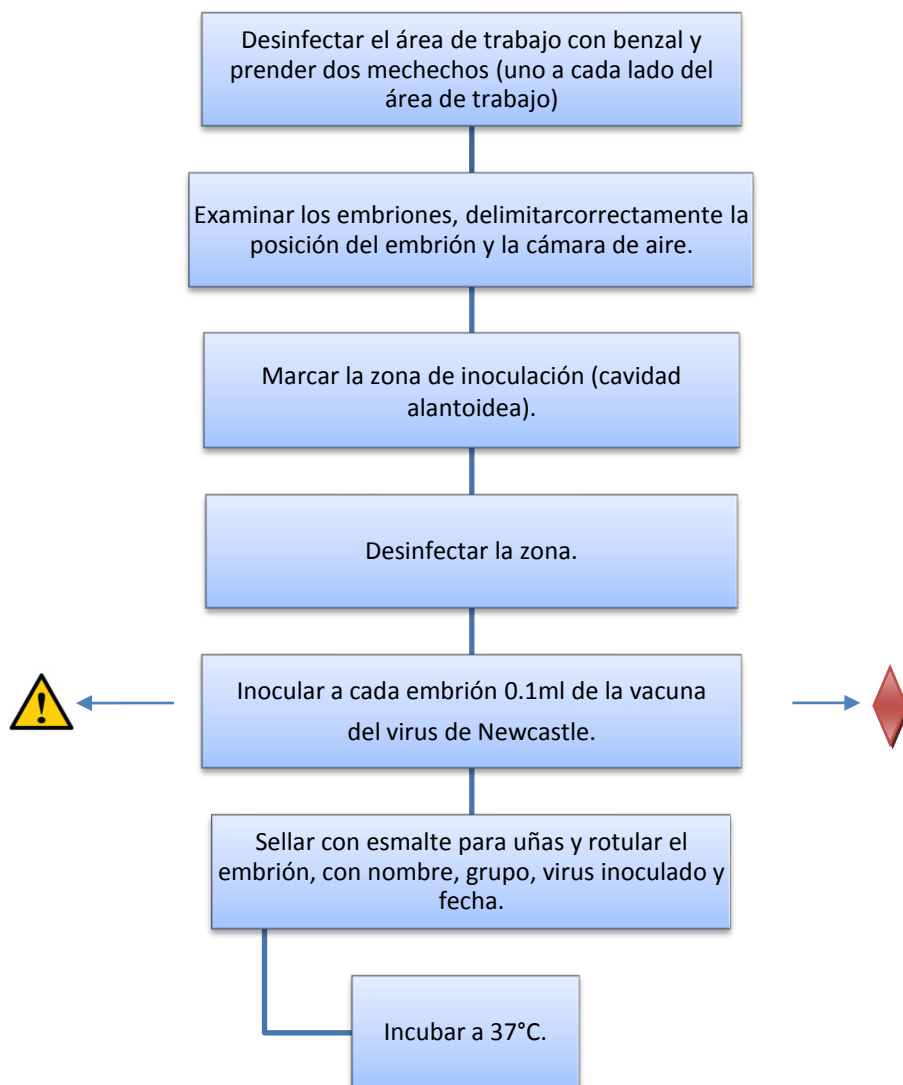
- Ovoscopio
- Centrífuga
- Incubadora (o estufa con temperatura ajustable)

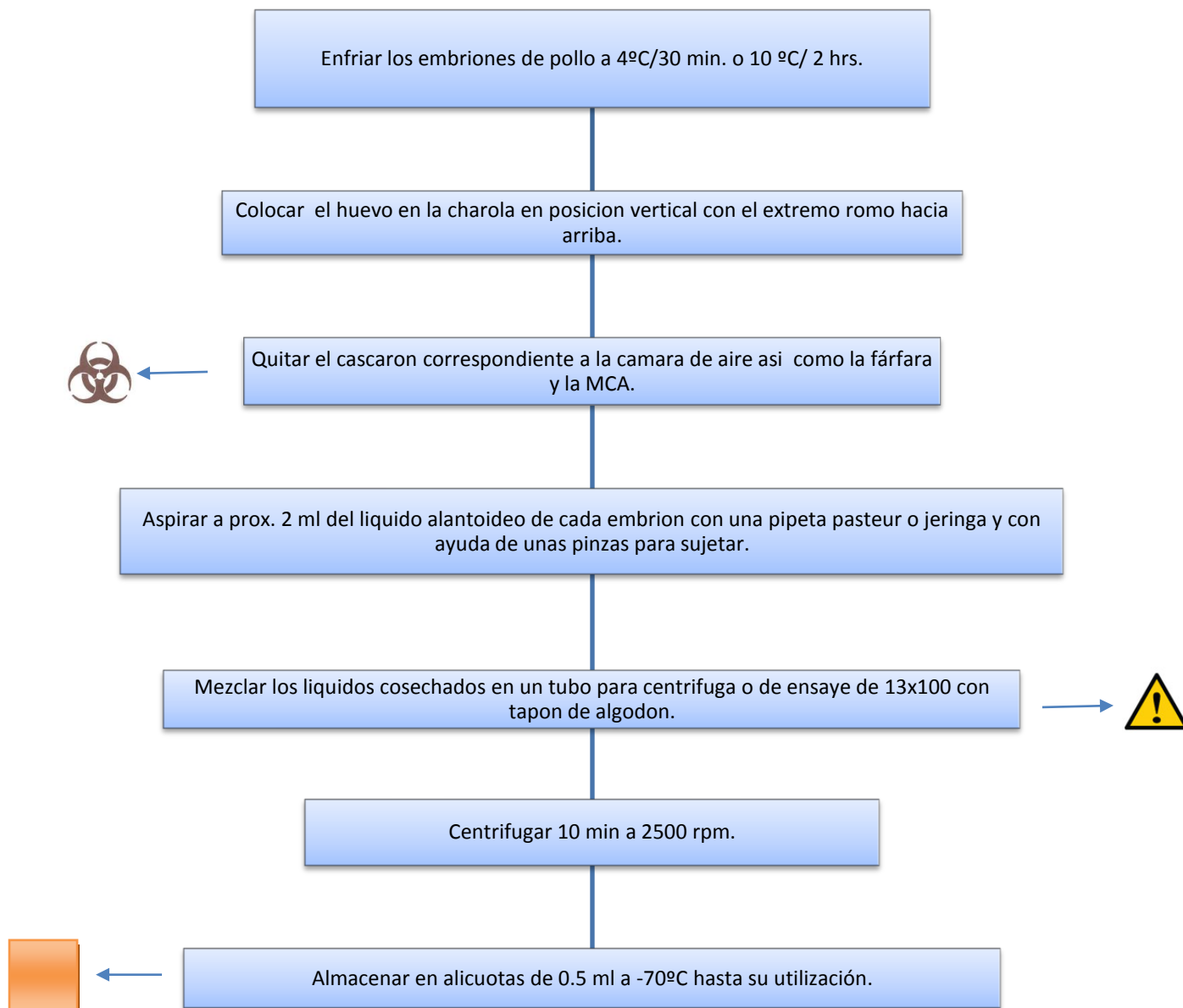
### **OTROS**

- 2 tubos de ensaye 13x100 con tapón de algodón
- 1 jeringa con calibre 14
- Pinzas de disección
- 1 lanceta
- Mechero
- Balanza de dos platos

## PROCEDIMIENTO

### INOCULACIÓN DE LOS EMBRIONES



**COSECHA DEL VIRUS.**

**NOTA: mantener un huevo sin inocular como control.**

## RESULTADOS

### INOCULACIÓN DEL VIRUS

Indica el volumen inoculado

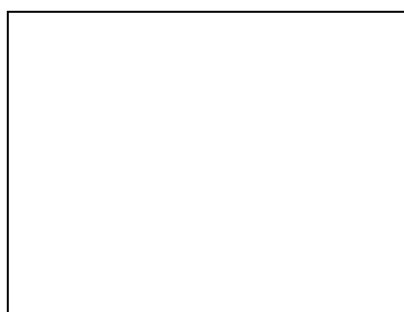
Embrión 1: \_\_\_\_\_

Embrión 2: \_\_\_\_\_

Embrión control: No se inocula

### COSECHA DEL VIRUS

Dibuja y describe el aspecto del líquido alantoideo de los 3 embriones.



Embrión 1

Volumen: \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_

Aspecto: \_\_\_\_\_

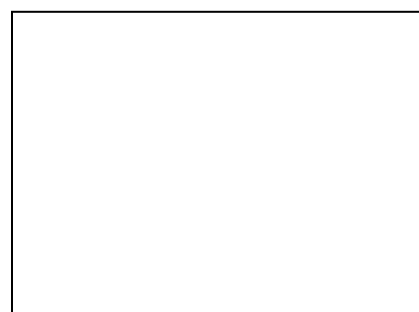


Embrión 2

Volumen: \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_

Aspecto: \_\_\_\_\_



Embrión control

Volumen: \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_

Aspecto: \_\_\_\_\_



## REFERENCIAS

- D.J. Alexander. **NEWCASTLE DISEASE AND OTHER AVIAN PARAMYXOVIRIDAE INFECTION**. DISEASES OF POULTRY. 10th ed., (1997), pp. 541–569.
- CUNNINGHAM, Charles. (1971). **VIROLOGÍA PRÁCTICA**. 6a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 66,67.
- LENNETTE, Edwin H., et.al. (1979). **DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR VIRAL, RICKETTSIAL AND CHLAMYDIAL INFECTIONS**. 5a ed. American Public Health Association. Washington, DC. pp.655-657.
- MERCHANT, I.A. (1980). **BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA VETERINARIAS**. 3a ed. Ed. Acribia. España. pp. 695-697.
- MORENO, Chan, Ricardo. **LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE Y ALGUNOS AVANCES RECIENTES DE DIAGNÓSTICO**. CIENCIA VETERINARIA. Lab de microbiología experimental. Departamento de medicina y zootecnia. Unam. Mexico DF.
- XIAOXIA LI, et al. **[OCCURRENCE AND TRANSMISSION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS AEROSOL ORIGINATING FROM INFECTED CHICKENS UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS](#)**. Veterinary Microbiology, **In Press**, **Corrected Proof**, Available online 11 November (2008).
- [www.viarural.com.ar/viarural.com.or/ganadería/aves/enfermedades/newcastle](http://www.viarural.com.ar/viarural.com.or/ganadería/aves/enfermedades/newcastle).

## PRACTICA No 4

### VIRUELA AVIAR

#### Objetivo:

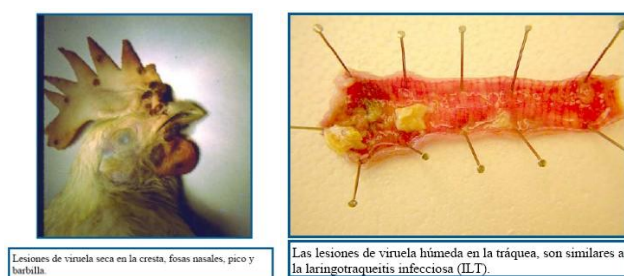
Inocular con virus de la viruela aviar huevos embrionados de pollo por la vía de la MCA mediante el método sugerido, para conocer las lesiones que produce en dicha membrana y realice la titulación de la partícula viral calculando las UFP/ml (unidades formadoras de pústulas por mililitro).

#### INTRODUCCIÓN

La viruela aviar tiene una distribución mundial y está causada por un virus DNA del género *Avipoxvirus* de la familia Poxviridae. Su incidencia es variable en diversas áreas debido a diferencias climáticas, de administración y de higiene, o a la práctica de una vacunación regular.

La viruela aviar es una enfermedad vírica de pollos y pavos de extensión lenta, que en la forma cutánea (viruela seca) se caracteriza por la aparición de lesiones proliferativas, que varían de pequeños nódulos a masas esféricas verrucosas sobre la piel de la cresta, barbillas y otras áreas sin plumas.

En la forma diftérica (viruela húmeda) se desarrollan en las membranas mucosas, nódulos opacos blancos, ligeramente elevados, cuyo tamaño aumenta con rapidez hasta formar una membrana diftérica amarillenta. Las lesiones se presentan en las membranas mucosas de la boca, esófago, laringe o tráquea.



**Fig. No 4a. Daño producido por viruela aviar en pollos.**

La enfermedad puede originar reducciones en la puesta de huevos o un retraso en el crecimiento de los pollos más jóvenes.

La tasa de mortalidad es mayor en la forma diftérica que en la cutánea, alcanzando a veces el 50%, sobre todo en aves jóvenes.

En el genoma del virus de la viruela aviar se ha observado la integración de secuencias del virus de la reticuloendoteliosis (REV).



Es interesante que este caso de inserción ocurriera hace más de 50 años. Mientras que la mayoría de las cepas naturales contienen el provirus del REV, las cepas vacunales solo tienen residuos de las largas repeticiones terminales.

La virulencia de las cepas naturales del virus de la viruela aviar aumenta con la presencia del provirus del REV en el genoma. Se ha secuenciado por completo el genoma de una cepa similar a la cepa vacunal del virus de la viruela aviar con lo que se pueden clonar fragmentos genómicos y se pueden emplear con eficacia como sondas de ácido nucleico para el diagnóstico.

### **Identificación del agente:**

Cuando ocurren erupciones en la piel de áreas descubiertas debe sospecharse de viruela aviar.

El examen histológico de lesiones cutáneas o diftéricas revela una hiperplasia epitelial con inclusiones intracitoplásmicas en las células afectadas.

En los frotis de las lesiones se pueden detectar cuerpos elementales utilizando el método de Giménez. Por tinción negativa o por cortes ultrafinos de la lesión, la microscopía electrónica detecta partículas víricas con la morfología característica de los poxvirus.

La forma diftérica de la viruela aviar con efectos sobre la tráquea debe diferenciarse de la laringotraqueitis, que está causada por un herpesvirus y que se caracteriza por la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares.

El aislamiento del virus se realiza por inoculación en membranas corioalantoideas de embriones de pollo de 9–12 días de desarrollo, o en cultivo de células aviares.

## **MATERIAL**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

- 2 Huevos embrionados de 9-12 días de desarrollo
- Vacuna de viruela aviar.

### **EQUIPO**

- Ovoscopio.
- Incubadora (o estufa con temperatura ajustable)

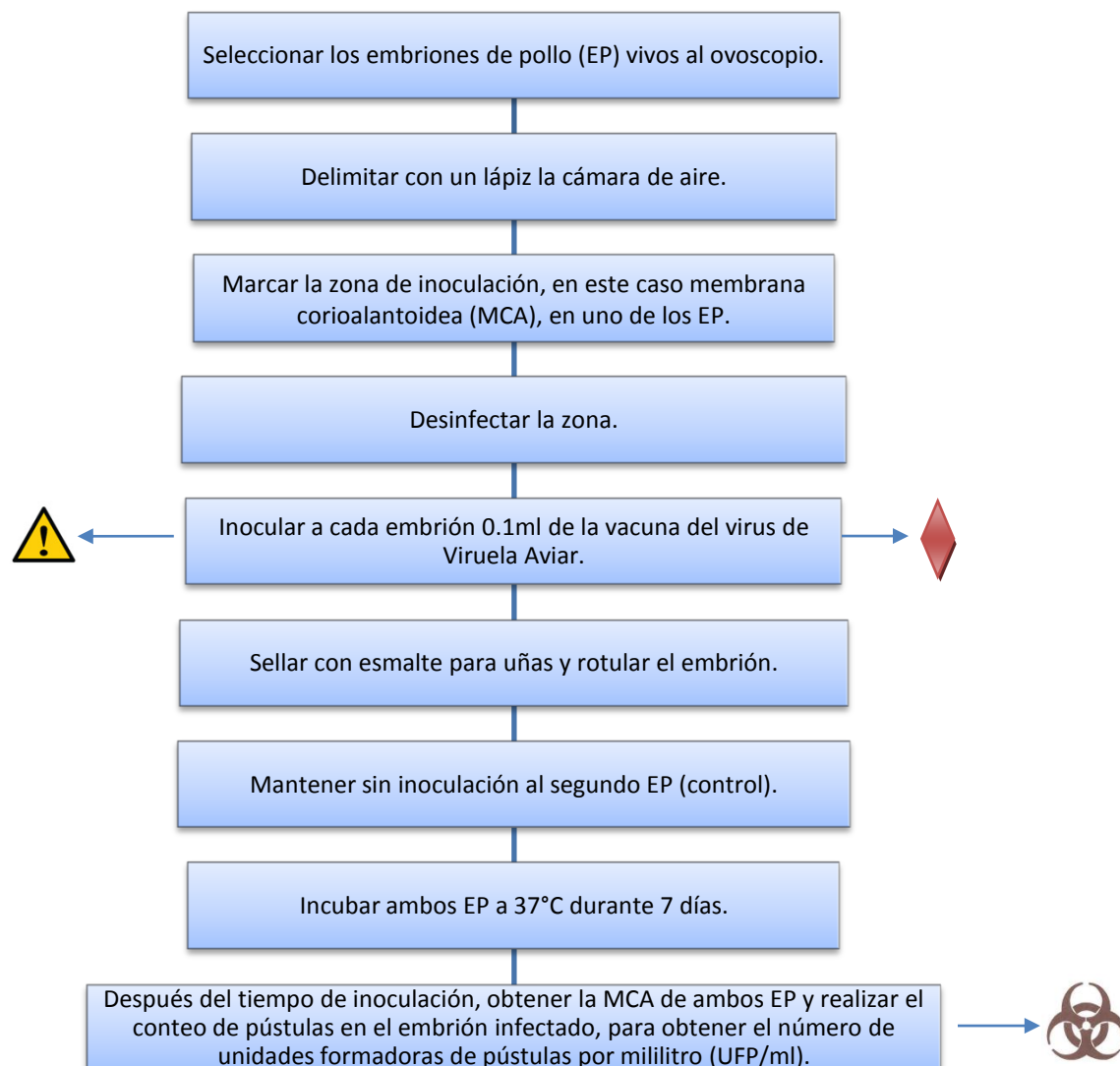
### **SOLUCIONES**

- Esmalte para uñas.
- Alcohol etílico al 70%.

### **OTROS**

- Jeringas de tuberculina.
- Agujas calibre 27
- Mecheros.
- Base para mecheros.
- Algodón.
- Pinzas de disección.
- Cajas petri.

## PROCEDIMIENTO



**NOTA: mantener un huevo sin inocular como control.**

## RESULTADOS

### INOCULACIÓN DE VIRUELA AVIAR

Indica el volumen inoculado

Embrión 1: \_\_\_\_\_

Embrión 2: \_\_\_\_\_

Embrión control: No se inocula.

### COSECHA DE VIRUELA AVIAR (MCA).

Dibuja y describe el aspecto de la MCA de los 3 embriones y anota el número de pústulas contadas.



Embrión 1

Color: \_\_\_\_\_

Aspecto: \_\_\_\_\_

# pústulas: \_\_\_\_\_



Embrión 2

Color: \_\_\_\_\_

Aspecto: \_\_\_\_\_

# pústulas: \_\_\_\_\_



Embrión control

Color: \_\_\_\_\_

Aspecto: \_\_\_\_\_

# pústulas: \_\_\_\_\_



## REFERENCIAS

- Centers for Disease Control and Prevention. **AVIAN INFLUENZA, INFECTIONS IN HUMANS** (2005).
- CUNNINGHAM, Charles. (1971). **VIROLOGÍA PRÁCTICA**. 6a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 67,68.
- MANUAL DE LA OIE SOBRE ANIMALES TERRESTRES. (2004),pp. 998-1001
- MERCHANT, I.A. (1980). **BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA VETERINARIAS**. 3a ed. Ed. Acribia. España. pp. 629-632.
- [www.avicultura.com.mx/articulos/sanidad/images](http://www.avicultura.com.mx/articulos/sanidad/images)

## PRACTICA No 5

### HEMAGLUTINACIÓN

#### Objetivo:

Conocer y aplicar la técnica de hemaglutinación empleando el líquido alantoideo cosechado en la práctica de Newcastle con el propósito de realizar la titulación de antígenos presentes.

#### INTRODUCCIÓN

La técnica de hemaglutinación es uno de los métodos indirectos más comunes de identificación de partículas víricas en suspensión; esta técnica no nos indica la infectividad del virus, pero si nos es posible obtener el título\* del virus a partir del punto final de actividad\*\*.

Esta técnica no es un método muy sensible, se requiere de una gran cantidad de partículas víricas para observar una hemaglutinación macroscópica, aunque tiene la ventaja de ser un método fácil y rápido para titular un gran número de muestras.

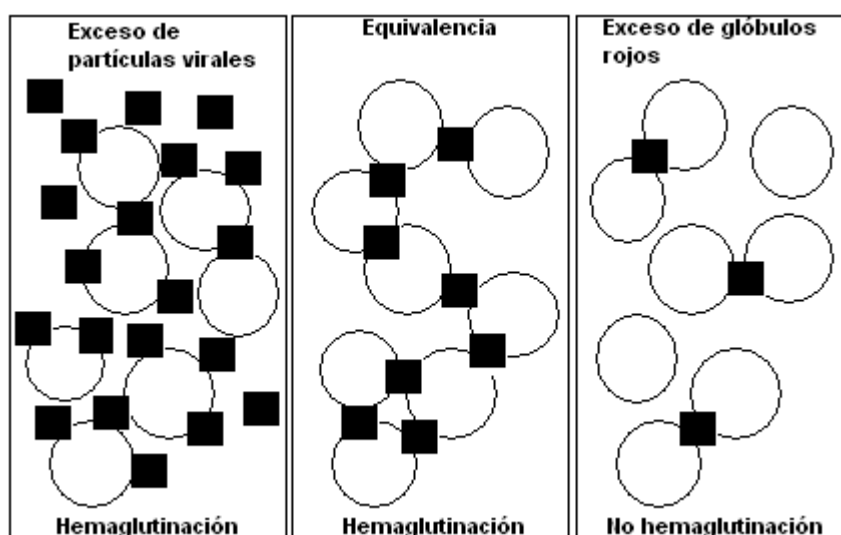


Fig. No 5a. Representación gráfica del fenómeno de hemoaglutinación.

Cabe mencionar que no todos los virus pueden ser sometidos a la titulación por hemaglutinación, ya que algunos virus solo hemaglutinan glóbulos rojos de ciertas especies animales, algunos otros requieren de pH y nivel de salinidad determinado. La temperatura de incubación también es un parámetro importante.

La hemaglutinación se define como la agregación de eritrocitos. Algunos virus poseen glicoproteínas presentes en la envoltura llamadas hemaglutininas que permiten le permiten unirse a la superficie del glóbulo rojo. Si varias partículas virales se unen a más de un glóbulo rojo, estos últimos sedimentarán en el pozo.

\*\*Punto final de actividad: dilución más alta del virus en que encontramos resultado positivo.

\*Título del virus expresado en HA: inverso del punto final de actividad.

## **MATERIAL**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

- Líquido alantoideo cosechado en la práctica Newcastle
- Suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5%
- 1 Vacuna virus de Newcastle

### **EQUIPO**

- Centrífuga
- Balanza de dos platos

### **SOLUCIONES**

- 1 Tubo con 2 ml de SSF ó PBS

### **OTROS**

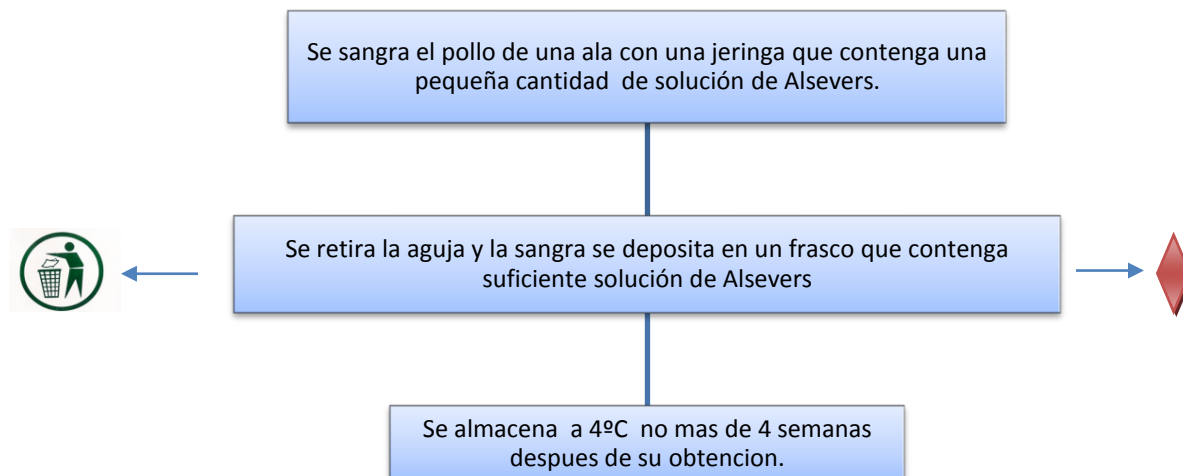
- 1 Microplaca de fondo "U"
- Mechero
- 1 Micropipeta 5-40  $\mu$ l
- Puntas amarillas para micropipeta
- 1 Frasco para desecho

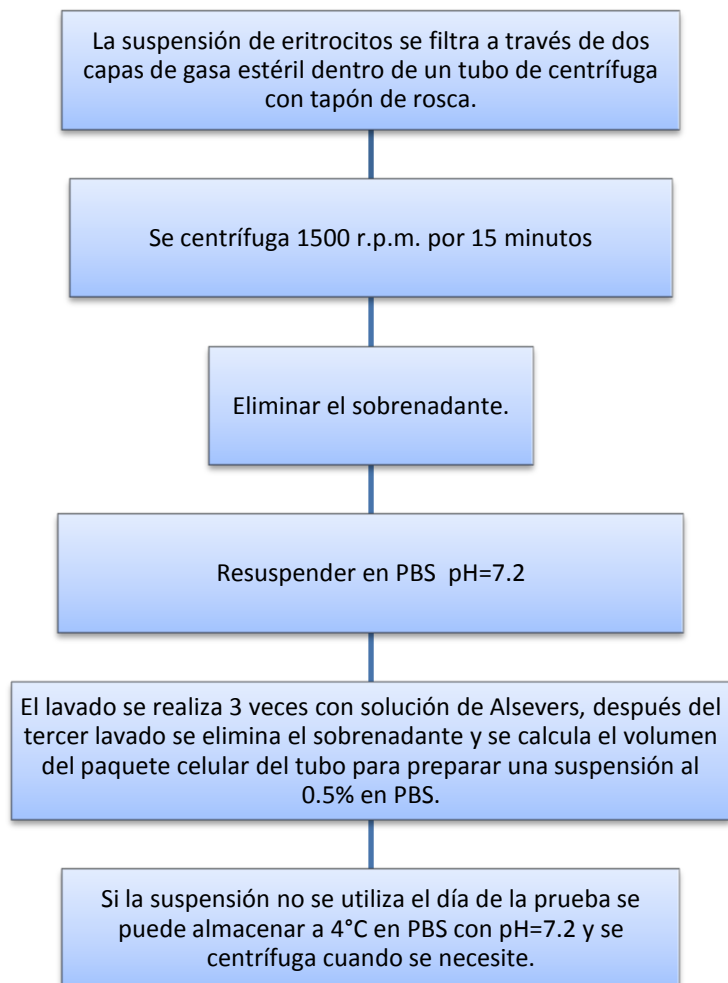


## PROCEDIMIENTO

### PREPARACIÓN DE GLÓBULOS ROJOS

#### Obtención.



**Lavado.****Estandarización.**

Adicionar 1% de albúmina bovina el día de la prueba.

## HEMAGLUTINACIÓN

1.- Preparar la microplaca sobre un fondo claro como indica el orden a continuación.

											Controles	
No. pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	+	-
SSF/PBS	---	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	----	25 μl
Virus (liq. Alnatoideo o vacuna)*	25 μl	25 μl								Desecho	25 μl	---
G.R.	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl

\* un equipo realizará la técnica utilizando una vacuna comercial para tener un control.

2.- Homogeneizar.

3.- Dejar reposar 30 min para lectura.

### LECTURA



(+) Presencia de malla



(-) Presencia de botón

## RESULTADOS

1. Subraya el espécimen utilizado en la titulación.

- a) Líquido alantoideo                      b) Vacuna

2. Completa el siguiente cuadro con los resultados grupales de la técnica de hemaglutinación.

**Tabla No 6a. Resultados grupales de HA.**

	D I L U C I O N E S											
Equipo	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	ctrl +	ctrl -
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												

3. Calcula el título hemaglutinante en unidades hemaglutinantes por mililitro (UHA/ml) de tus resultados.



## EJERCICIOS

### PREPARACIÓN DE GR.

1.- Realiza el calculo para preparar 25 ml de una suspensión de glóbulos rojos al 0.5% en PBS

2.- ¿A que pH debe tener el PBS y porque?

3.- ¿Qué otros diluyentes se pueden utilizar en lugar de PBS?

## HEMAGLUTINACIÓN

A partir de los siguientes resultados de hemaglutinación, calcular el punto final de actividad y el título expresado en HA.

### EJEMPLO

D	I	L	U	C	I	O	N	E	S		
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	ctrl	ctrl

Punto final de actividad: 1:32  
título: 32UHA/ml

### Ejercicio No 1

D	I	L	U	C	I	O	N	E	S		
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	ctrl	ctrl

### Ejercicio No 2

D	I	L	U	C	I	O	N	E	S		
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	ctrl	ctrl

## REFERENCIAS

- BURLESON, Florence G., (1992). **VIROLOGY A LABORATORY MANUAL**, Academic Press, inc., U.S.A., pp.86
- CUNNINGHAM, Charles. (1971). **VIROLOGÍA PRÁCTICA**. 6a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 133-135, 139.
- GOLDSTEIN, Gerald. (1992). **INTRODUCTORY EXPERIMENTS IN VIROLOGY**. Wm. C.Brown Publishers, U.S.A. pp.89
- KILLAN ML. **HEMAGGLUTINATION ASSAY FOR THE AVIAN INFLUENZA VIRUS**. Avian viruses Section, Diagnostic Virology Laboratory, National Veterinary Services Laboratories, US Department of Agriculture (2008) 436:47-52.
- LIBIA, Herrero Uribe. (2004). **PROCEDIMIENTOS EN VIROLOGÍA MÉDICA**. Ed. Univesidad de Costa Rica. México. pp. 109
- LLOP, Hernández et al. (2001). **MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICAS**. Tomo II. Ed. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. pp. 18
- MERCHANT, I.A. (1980). **BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA VETERINARIAS**. 3a ed. Ed. Acribia. España. pp. 585-589.
- [www.imbiomed.com](http://www.imbiomed.com)
- [www.virologia.fcien.edu.uy/images](http://www.virologia.fcien.edu.uy/images)



## PRACTICA No 6

### INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

#### **Objetivo:**

Conocer y aplicar la técnica de inhibición de la hemaglutinación empleando un suero hiperinmune y el líquido alantoideo cosechado en la práctica de Newcastle para realizar la titulación de anticuerpos presentes en el suero.

#### **INTRODUCCIÓN**

El diagnóstico de las entidades virales es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la medicina actual, particularmente en países donde el diagnóstico viral se hace de manera empírica.

Durante las últimas décadas, el desarrollo progresivo de nuevas y mejores herramientas para evidenciar las causas de tipo viral, hace posible que estas entidades se puedan descubrir y estudiar no sólo a nivel de laboratorios especializados, sino también en los comunes.

Las pruebas diagnósticas simples, rápidas y poco costosas para la demostración de antígenos han reemplazado las técnicas tradicionales, largas y tediosas; esto ha producido una mayor agilidad en la definición del diagnóstico.

La inhibición de la hemaglutinación (al igual que la HA) es una prueba de diagnóstico fundamentada en la respuesta inmunitaria y se basa en la capacidad de algunos patógenos (p.ej. el virus de la influenza) para causar la aglutinación de los eritrocitos. Se utiliza para detectar los anticuerpos dirigidos contra las hemaglutininas del microorganismo.

Para cuantificar los anticuerpos se hacen diversas diluciones del suero con el fin de hacer una titulación y determinar el nivel de anticuerpos del paciente.

Esta prueba al principio se utilizó para demostrar anticuerpos contra rubéola y dengue, pero se ha reemplazado por ELISA, pues la IHA no puede diferenciar entre anticuerpos tipo IgM (infección aguda) o IgG (infección antigua), sin embargo aún se utiliza para influenza y para otros virus menos abundantes que poseen actividad hemaglutinante como los arbovirus (p.e., virus de la fiebre amarilla), reovirus y algunos enterovirus.

## **MATERIAL**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

- Suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5%

### **EQUIPO**

- Centrífuga
- Balanza de dos platos
- Incubadora o estufa con temperatura ajustable

### **SOLUCIONES**

- 1 Tubo con 2 ml de SSF ó PBS

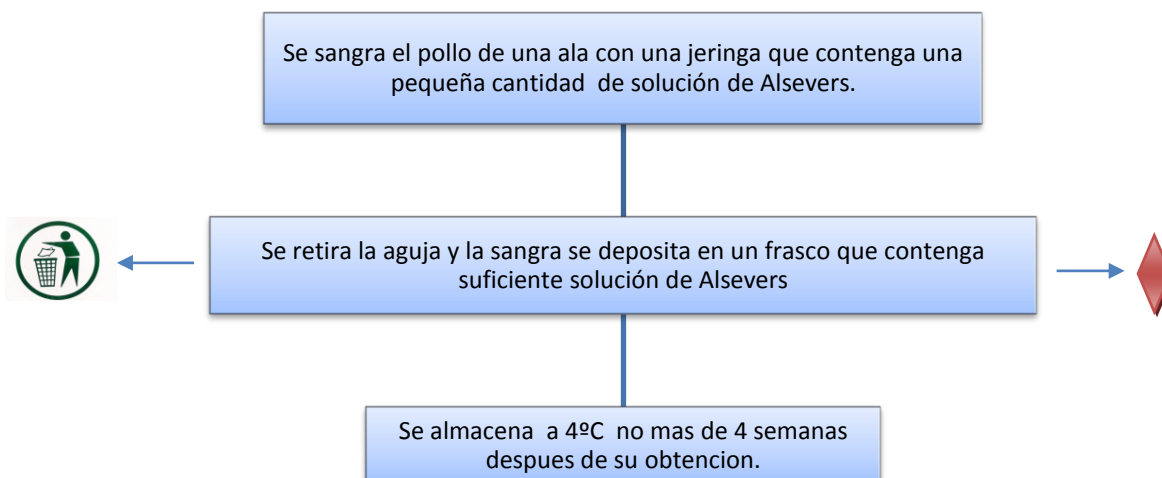
### **OTROS**

- 1 Microplaca de fondo “u”
- Mechero
- 1 Micropipeta 5-40  $\mu$ l
- Puntas amarillas para micropipeta
- 1 Frasco para desecho

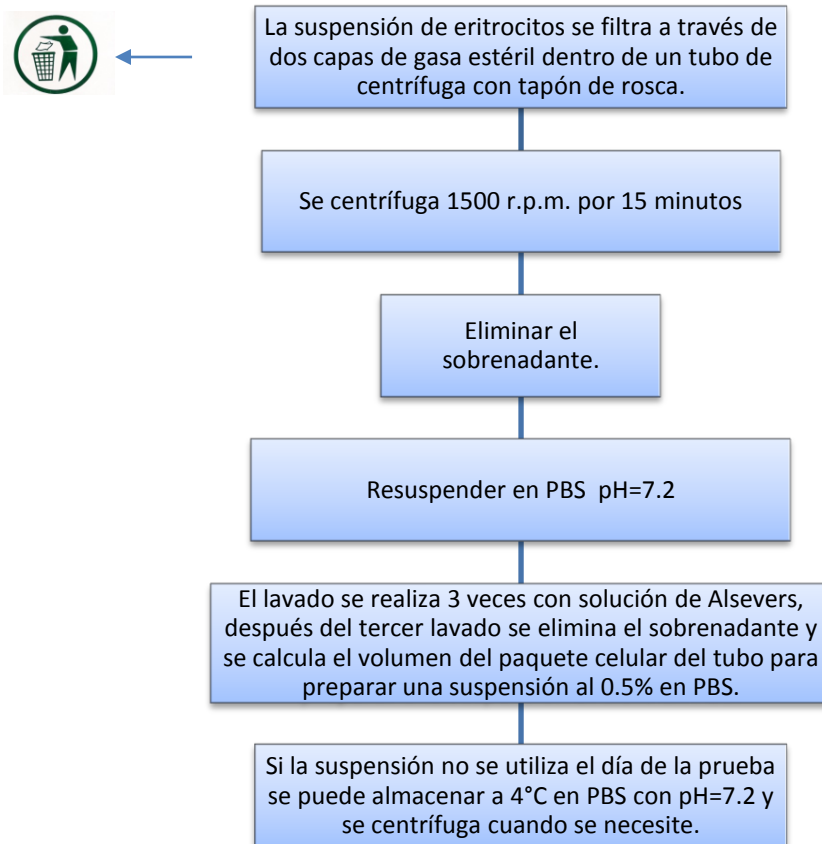
## PROCEDIMIENTO

### PREPARACIÓN DE GLÓBULOS ROJOS

#### Obtención



#### Lavado



#### Estandarización.

Adicionar 1% de albúmina bovina el día de la prueba.

## INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

1. Preparar la microplaca sobre un fondo claro como indica el orden a continuación.

											Controles	
No. pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	+	-
SSF/PBS	---	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	----	25 $\mu$ l
Suero (Ab)	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l								25 $\mu$ l	---	
Ag Con 4UHA	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
<b>INCUBAR 30 min (HASTA 1 – 4 Hr), 37°C o 4°C DE ACUERDO AL TIPO DE VIRUS</b>												
G.R.	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
<b>INCUBAR 1 – 4 Hr, 37°C o 4°C DE ACUERDO AL TIPO DE VIRUS</b>												

### LECTURA



(-) Presencia de malla



(+) Presencia de botón

## RESULTADOS

1.- Subraya el espécimen utilizado en la titulación.

a) Líquido alantoideo

b) Vacuna

2.- Completa el siguiente cuadro con los resultados grupales de la técnica de hemaglutinación.

**Tabla No 7a. Resultados grupales de IHA.**

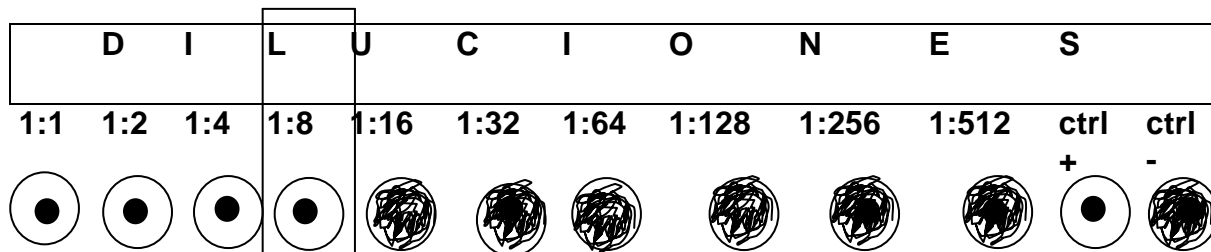
	D I L U C I O N E S											
Equipo	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	ctrl +	ctrl -
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												

3. Calcula el título de IHA/ml (unidades no hemaglutinantes por mililitro)

## EJERCICIOS DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTININACIÓN

A partir de los siguientes resultados calcula el punto final de actividad y el título de IHA/ml.

### EJEMPLO



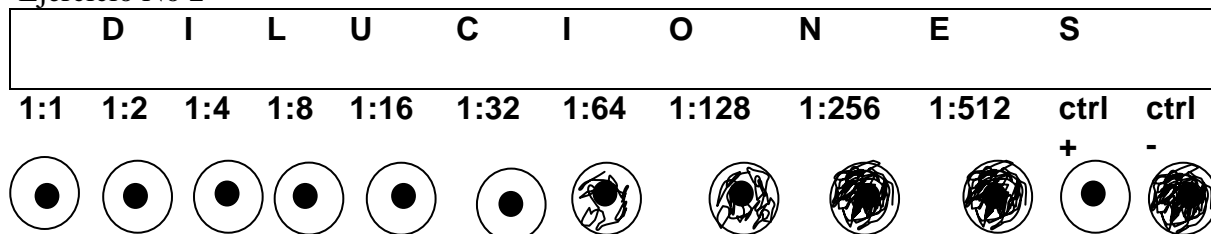
Punto final de actividad: 1:8

Título de IHA: 8IHA/ml

### Ejerció No 1



### Ejercicio No 2





## REFERENCIAS

- BURLESON, Florence G. (1992). **VIROLOGY A LABORATORY MANUAL**. Academic Press, inc., U.S.A. pp.86
- CUNNINGHAM, Charles. (1971). **VIROLOGÍA PRÁCTICA**. 6a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 133-135,139.
- GOLDSTEIN, Gerald. (1992). **INTRODUCTORY EXPERIMENTS IN VIROLOGY**. Wm. C.Brown Publishers. U.S.A. pp.89
- LIBIA, Herrero Uribe. (2004). **PROCEDIMIENTOS EN VIROLOGÍA MÉDICA**. Ed. Univesidad de Costa Rica. México. pp. 145-146
- MERCHANT, I.A. (1980). **BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA VETERINARIAS**. 3a ed. Ed. Acribia. España. pp. 585-589.
- [www.virologia.fcien.edu.uy/images](http://www.virologia.fcien.edu.uy/images)



## PRACTICA No 7

### LAVADO DE MATERIAL

#### Objetivo:

Comprender la importancia del lavado, secado y esterilización del material requerido para la práctica de cultivo celular para la obtención de resultados confiables en el laboratorio de Virología Médica.

#### INTRODUCCIÓN

La limpieza perfecta del material de vidrio que se va a utilizar en los Laboratorios reviste una gran importancia. Antes de usar cualquier material de laboratorio, se debe asegurar que está limpio.

Generalmente, este material se limpia con una solución de un buen detergente seguido del enjuague con agua de chorro y luego con agua destilada. A fin de facilitar la limpieza de estos equipos, generalmente los laboratorios están dotados de cepillos de diferentes tamaños, adecuados a las exigencias de los mismos.

Si quedan gotas adheridas a las paredes del material, es indicio de que no está completamente limpio por lo que es recomendable el uso de mezcla sulfocrómica o potasa alcohólica seguido de un enjuague con agua de chorro y por último agua destilada.

Cuando el experimento lo requiera, es aconsejable secar el material, pero sin contaminarlo. A tal efecto se recomienda el dejar escurrir bien, o secarlo en la estufa o mediante el uso de aire comprimido libre de grasa.

En un laboratorio de virología es muy importante el lavado de todo el material y en especial la cristalería, fundamentalmente la utilizada para cultivos celulares, deben ser sumergidos en una solución de cloro al 4% durante 18 horas, enjuagarlas con agua corriente 5 veces, luego sumergir el material en una solución de HCl al 2% durante el mismo tiempo y por último se enjuaga 5 más con agua corriente y 5 veces con agua destilada.

Estas medidas evitan que otras proteínas o sustancias químicas de adhieran al vidrio ocasionando un mal cultivo celular.

Tanto el material de vidrio como de metal u otro material se utiliza perfectamente estéril y seco, es por esto que se utilizan técnicas de esterilización de diferentes principios (como las basadas en calor húmedo, calor seco o técnicas químicas).

## **MATERIAL**

### **EQUIPO**

- Autoclave
- Horno Pasteur

### **SOLUCIONES**

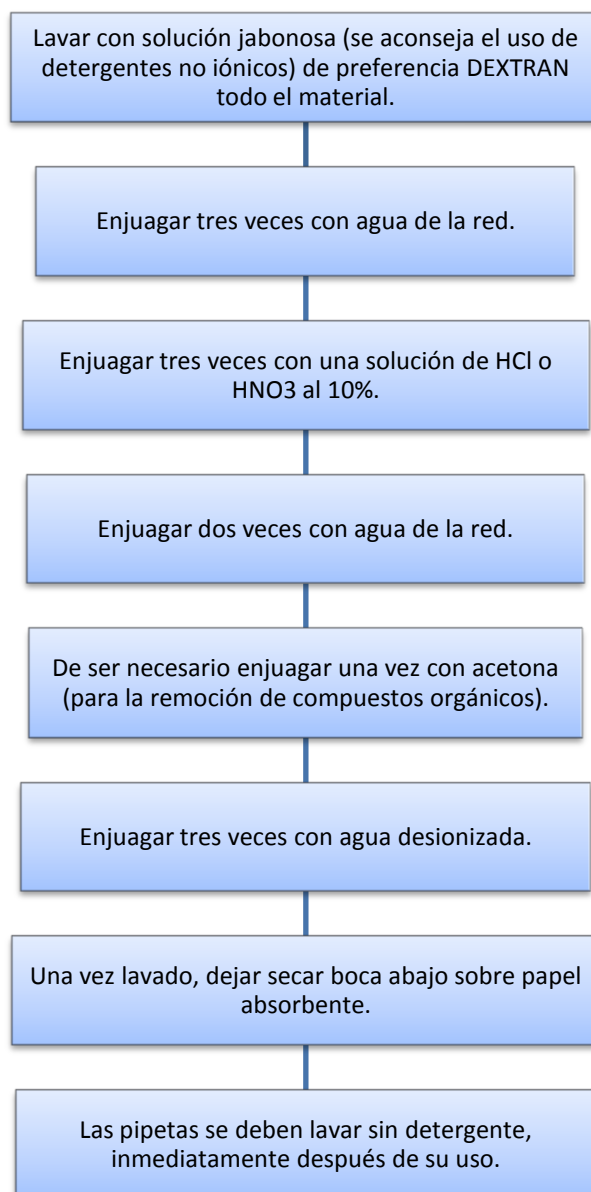
- Alcohol al 70%
- Medio DMEM
- Solución de antimicótico/antimicrobiano
- Solución de tripsina-verseno al 0.025% en PBS
- Suero fetal bovino
- Carbonato de calcio (en caso de requerir ajustar el pH)

### **OTROS**

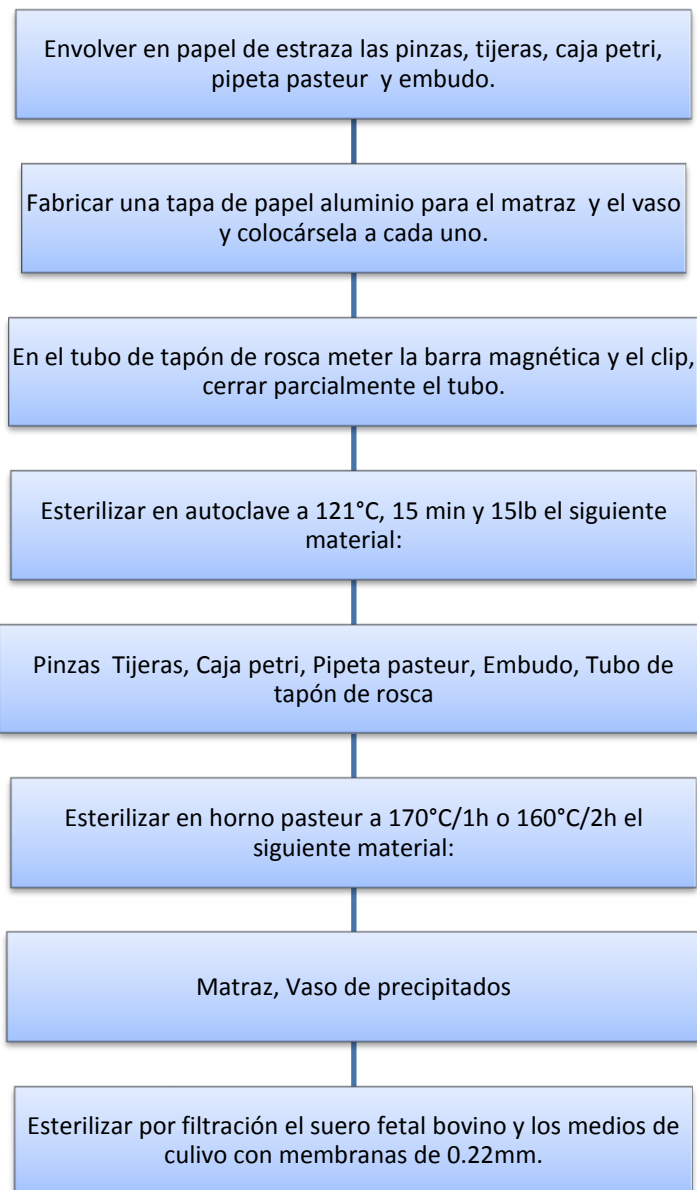
- Barra magnética
- Caja petri
- Matraz Erlenmeyer de 200ml
- Vaso de precipitados de 500ml
- Tubo con tapón de rosca estéril
- Tijeras
- pinzas
- Clip
- Embudo de vidrio
- Tela de organza nueva
- Pipeta pasteur
- Papel aluminio
- Masking tape

## PROCEDIMIENTO

### PREPARACION DEL MATERIAL



## ESTERILIZACIÓN



## CONCLUSIONES

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## REFERENCIAS

- LIBIA, Herrero Uribe. (2004). **PROCEDIMIENTOS EN VIROLOGÍA MÉDICA**. Ed. Univesidad de Costa Rica. México. pp. 19-21
- LLOP, Hernández, Alina. (2001). **MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICAS**. Tomo II, Edit. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. pp. 19.

## PRACTICA No 8

### CULTIVO CELULAR

#### Objetivo:

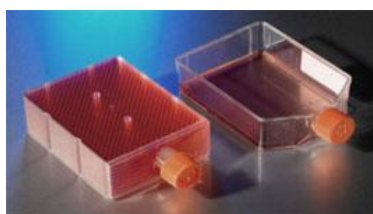
Obtener un cultivo primario a partir de fibroblastos de embrión de pollo y que aplique condiciones óptimas para mantener viable este sistema biológico.

### INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares son un procedimiento tecnológico de mantenimiento y estudio de células vivas en un medio artificial que permite reproducir, de forma bastante fiable, las condiciones biológicas que las células tienen en su lugar de origen.



Matraz para cultivo celular que ahorra espacio, 3 matraces cubren 100 cm<sup>2</sup>



Matraz superficie tratada Corning Cellbind área de siembra de 1720 cm<sup>2</sup>, 10 veces mayor que cualquier matraz estándar en su tipo



Botellas de policarbonato para almacenamiento, hasta 1 ..

Fig. No 8a. Tipos de contenedores para cultivo celular.

Potencialmente todas las células son cultivables, pero cada una de ellas presenta peculiaridades y requerimientos específicos. Ello hace que existan numerosos modelos diferenciados de cultivo celular .

Según su estructura, se pueden diferenciar tres grandes grupos de cultivo celular: cultivo de órgano, cultivo de tejido y cultivo de células aisladas. En el cultivo de órgano y de tejido, se mantienen la estructura y función intactas del órgano entero o de una parte del mismo, sin disociar sus células. Se dispone así de una población heterogénea de células que se puede mantener sólo durante un período de tiempo limitado.

El cultivo de células aisladas es un sistema biológico que logra la supervivencia fuera del organismo de células independientes, pero capaces de dividirse y mantener sus funciones in vitro. Esta última modalidad se denomina también cultivo en monocapa o suspensión y es la más utilizada habitualmente.

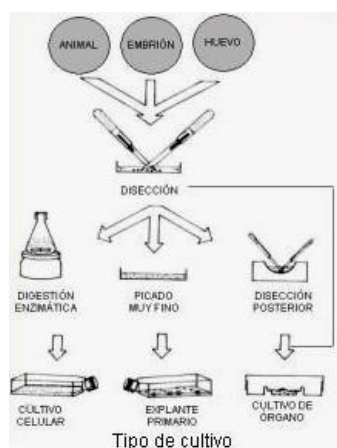
Según la fuente de obtención de células, un cultivo se denomina primario si procede directamente del organismo vivo, y secundario cuando se obtiene de la resiembra de otro cultivo. A partir de este punto se puede hablar de líneas celulares, ya que se trata de células que mantienen sus características de una forma constante y homogénea durante un largo tiempo.

Cuando las células a cultivar se encuentran libres o circulantes en su origen, pueden cultivarse en suspensión. Si las células proceden de un tejido compacto, deben primero someterse a técnicas de disociación mecánica y/o enzimática que las independicen y faciliten así su contacto entre sí y con la superficie de cultivo.

Las células deben mantenerse en unas condiciones ambientales y nutritivas correctas para su subsistencia, para ello se incluyen en un medio de cultivo apropiado. Aun cuando la mayoría de medios de cultivo presentan una composición similar, cada tipo celular tiene unos requerimientos diferenciales.

Por ello, se han desarrollado numerosos medios de cultivo específicos para un determinado tipo celular. A los medios de cultivo es frecuente añadirles suero con el objeto de mejorar sus características citodinámicas.

Se denominan medios de base los que contienen una cierta concentración de suero y medios definidos los que prescindan de este elemento y presentan una composición tanto cualitativa como cuantitativa perfectamente conocida. Además del medio de cultivo, existen diversos aditivos como son los extractos embrionarios, hormonas (corticoides, insulina) y los factores de crecimiento que pueden ayudar a modificar las características de la dinámica de reproducción y diferenciación de las células en cultivo



**Fig. No 8b. Tipos de cultivo celular.**

Las ventajas cuando se utilizan los cultivos celulares son: el control de las características fisicoquímicas (pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno y gas carbónico, etc) de las células cultivadas y las condiciones fisiológicas que deben ser constantes; se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherentes asociado al uso de animales de experimentación; suponen una economía en el uso de reactivos o sustancias a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la sustancia, las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en el animal completo.

Como desventajas encontramos que las técnicas de cultivo celular necesitan unas estrictas condiciones de asepsia porque las células animales crecen menos rápido que la mayoría de los

contaminantes comunes como las bacterias, los mohos y las levaduras; las células precedentes de animales no pueden desarrollarse en medios de cultivo, por lo que es necesario agregar a los medios suplementos como suero, plasma y fluidos intersticiales, entre otros para proveer un medio semejante al *in vivo*; el costo de producción de 1 g de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal.

Asimismo existe una limitación de producción, que es del orden de 10 g de células en un laboratorio normal, y que para ser superior a 100 g requiere instalaciones de tipo industrial.

## **MATERIAL**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

- Embrión de pollo de 10 días de desarrollo

### **EQUIPO**

- Ovoscopio
- Agitador magnético
- Centrífuga
- Microscopio inverso
- Incubadora o estufa con temperatura ajustable

### **SOLUCIONES**

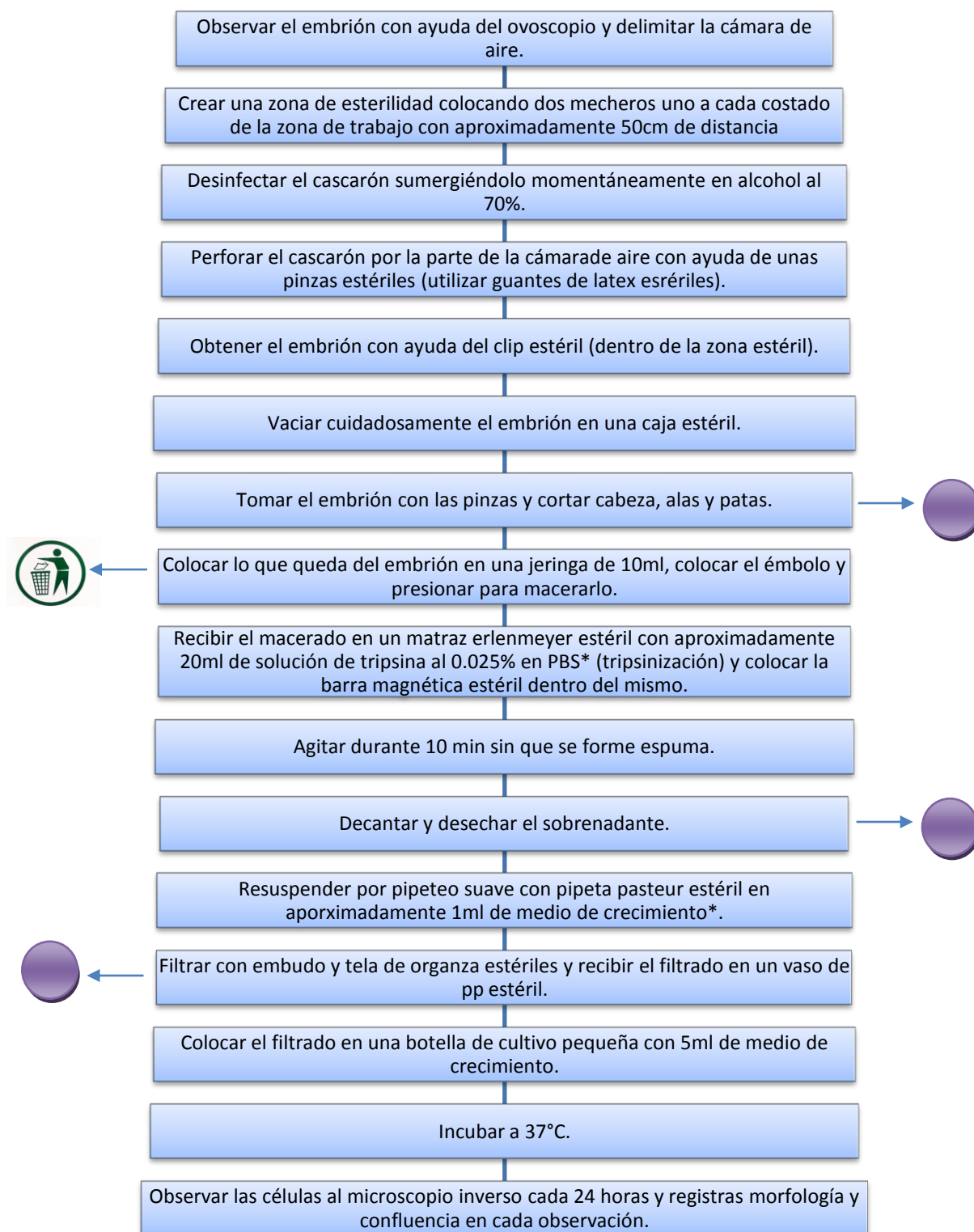
- Medio DMEM (Medio Esencial Mínimo modificado por Dulbecco)
- Solución de antimicótico/antimicrobiano
- Solución de tripsina-verseno al 0.025% en PBS
- Suero fetal bovino
- Carbonato de calcio (en caso de requerir ajustar el pH)
- Alcohol al 70%

### **OTROS**

- 2 Mecheros
- Base para mechero
- Barra magnética estéril
- Caja petri estéril
- Pinzas estériles
- Jeringa de 10ml
- Matraz Erlenmeyer de 200ml estéril
- Vaso de precipitados de 500ml
- Tubo con tapón de rosca estéril
- Tijeras estériles
- Clip estéril
- Embudo de vidrio estéril
- Gasa estéril
- Una botella pequeña para cultivo
- Guantes
- Pipeta Pasteur estéril



## PROCEDIMIENTO



\*Ver anexo No 3 para preparación de medios utilizados.

**RESULTADOS**

Llena la siguiente tabla con tus resultados

<b>DIA</b>	<b>COLOR DEL MEDIO</b>	<b>MORFOLOGÍA CELULAR</b>	<b>ESQUEMA</b>
<b>1</b>			
<b>2</b>			
<b>3</b>			
<b>4</b>			
<b>5</b>			
<b>6</b>			
<b>7</b>			



## REFERENCIAS

- CLASSEN-LINKE, M. Kusche, R. Knauthe and H.M. Beier. **ESTABLISHMENT OF A HUMAN ENDOMETRIAL CELL CULTURE SYSTEM AND CHARACTERIZATION OF ITS POLARIZED HORMONE RESPONSIVE EPITHELIAL CELLS.** *Cell Tissue Res* **287** (1997), pp. 171–185.
- CUMMING, Hamish. (1975). **VIROLOGÍA CULTIVO DE TEJIDOS.** Ed. El Manual Moderno. México. pp. 27-35, 37-42.
- CUNNINGHAM, Charles. (1971). **VIROLOGÍA PRÁCTICA.** 6a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 92, 93, 100-103.
- FRESHNEY, R. I. (1986). **ANIMAL CELL CULTURE, A PRACTICAL APPROACH.** Ed. IRLPRESS. Oxford, Washington D. C. pp. 3-11,13,28,46.
- H. TAKAHASHI, K. Iga, T. Sato, M. Takahashi and A. Okano. **ISOLATION AND CULTURE OF BOVINE ENDOMETRIAL EPITHELIAL CELLS IN A SERUM-FREE CULTURE SYSTEM.** *J Reprod Dev* **47** (2001), pp. 181–187.
- LLOP, Hernández, Alina. **MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICAS.** (2001). Tomo II, Edit. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. pp. 16.
- LIBIA, Herrero Uribe. (2004). **PROCEDIMIENTOS EN VIROLOGÍA MÉDICA.** Ed. Univesidad de Costa Rica. México. pp. 27-46.
- MERCHANT, I.A. (1980). **BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA VETERINARIAS.** 3a ed. Ed. Acribia. España. pp. 611-614.
- R.G. Giffard, Y.-B. Ouyang. **CELL CULTURE: PRIMARY NEURAL CELLS.** *Encyclopedia of Neuroscience* (2009). Pages 633-637 [www.virologia.fcien.edu.uy/images](http://www.virologia.fcien.edu.uy/images)
- [www.ceniap.gov.ve/pdf/revistatecnicas/ceniaphoy/articulos](http://www.ceniap.gov.ve/pdf/revistatecnicas/ceniaphoy/articulos)

## **PRACTICA No 9**

### **PASE CELULAR**

#### **Objetivo:**

Realizar un pase celular a partir de un cultivo primario y/o línea celular mediante un proceso enzimático para mantener la viabilidad celular.

#### **INTRODUCCIÓN**

El pase celular o subcultivo se emplea para mantener las células viables y en óptimas condiciones.

El número de pases se refiere al número de veces que las células han sido transferidas desde que el cultivo madre fue obtenido.

El cultivo celular es confluyente cuando las células ocupan toda el área de crecimiento de la botella de cultivo.

Después de obtener una monocapa confluyente es posible transferirlas a 2 ó 3 superficies iguales a la antes ocupada.

La monocapa celular puede ser tratada con una solución libre de enzimas compuesta de calcio y magnesio. También se emplean enzimas entre las que se encuentran tripsina, colagenasa y pronasa. El tratamiento enzimático puede dañar las células por lo tanto se recomienda minimizar el tiempo de exposición del cultivo a las enzimas. En algunas ocasiones se emplea EDTA (agente quelante) solo o en combinación con tripsina.

Las células que crecen en suspensión no necesitan ser tripsinizadas.

Las células en suspensión se centrifugan, se elimina el medio y las células se resuspenden en una pequeña cantidad de medio de cultivo. Una pequeña cantidad de esas células es transferida dentro de una nueva botella de cultivo con medio de cultivo fresco.

El pase celular requiere de 3 días para retomar la confluencia.

## **MATERIAL**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

- 1 Botella de cultivo con monocapa celular confluyente

### **EQUIPO**

- Microscopio de campo invertido

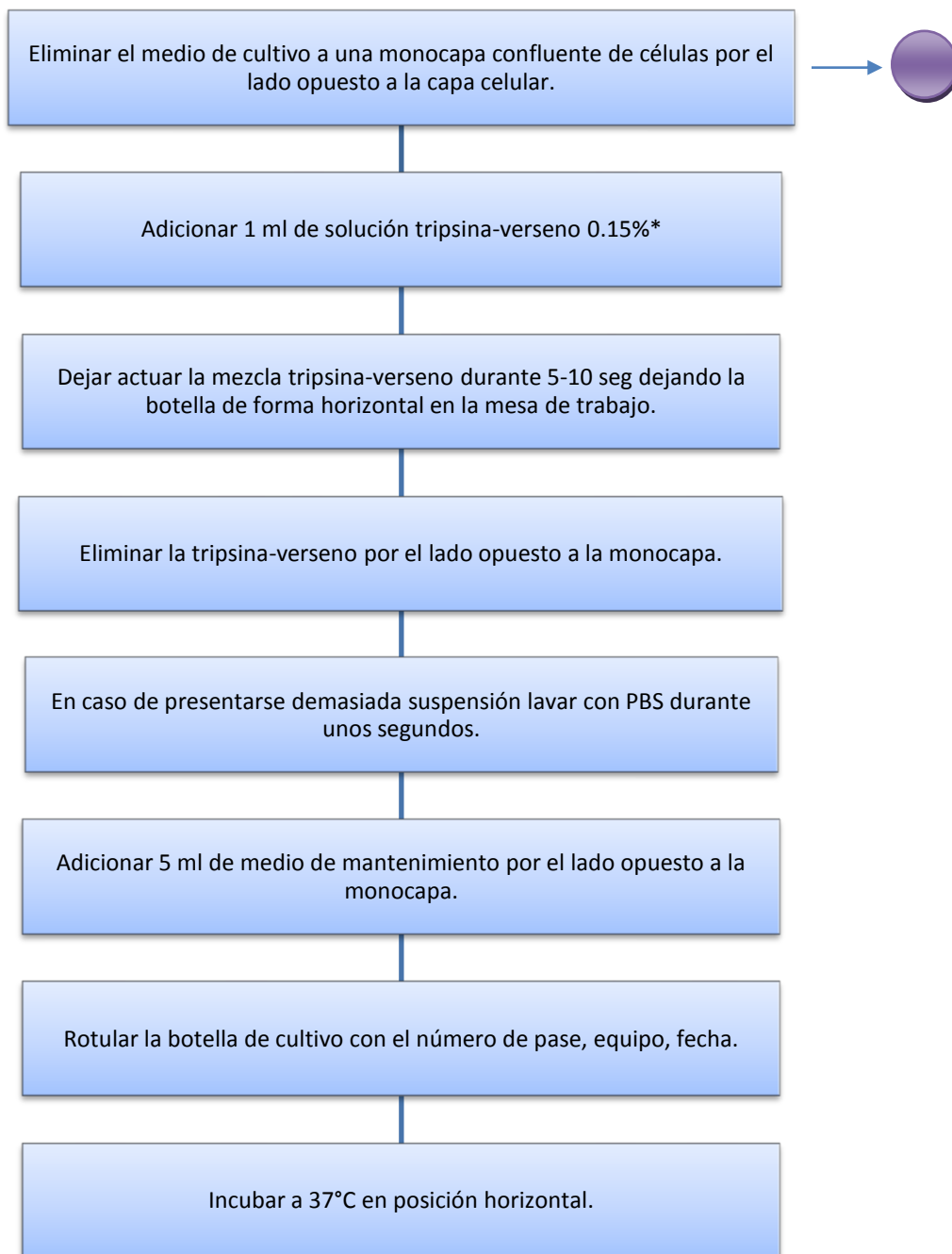
### **SOLUCIONES**

- Medio DMEM
- Solución de antimicótico/antimicrobiano
- Solución de tripsina-verseno al 0.025% en PBS
- Suero fetal bovino
- Carbonato de calcio (en caso de requerir ajustar el pH)
- PBS

### **OTROS**

- 1 Pipeta de 5 ml
- 1 Pipeta de 1ml
- 1 Frasco para desecho
- 1 Botella de cultivo nueva
- Mechero

## PROCEDIMIENTO



\*Ver anexo No 3 para preparación de medios utilizados.





**REFERENCIAS**

- **BURLESON, Florence G. (1992). VIROLOGY A LABORATORY MANUAL.** Academic Press, inc., U.S.A. pp.14-15
- **FRESHNEY, R. I. (1986). ANIMAL CELL CULTURE, A PRACTICAL APPROACH.** Ed. IRLPRESS. Oxford, Washington D. C. pp. 371-373.

## PRÁCTICA No 10

### INFECCIÓN DE CULTIVO CELULAR

#### Objetivo:

Infectar un cultivo celular confluyente con una suspensión de virus de Newcastle para observar el efecto citopático que este produce.

#### INTRODUCCIÓN

La imposibilidad por parte de los virus de multiplicarse en medios sintéticos inanimados hace necesario el empleo de células vivas, ya sean cultivos celulares o en hospederos animales.

El uso de cultivos celulares para este fin ofrece muchas ventajas para el estudio de las interacciones virus-célula y de los procesos metabólicos, entre ellas encontramos:

- Acceso directo del virus a la superficie celular.
- Pueden llevarse a cabo estudios metabólicos e histopatológicos.
- Los cultivos celulares están libres de anticuerpos, de hormonas y de otros factores similares procedentes del hospedero que impidan la multiplicación del virus.

En el trabajo con virus se han utilizado extensamente cultivos primarios obtenidos por tripsinización de células embrionadas o adultas, procedentes de diversas fuentes. Es evidente que estos cultivos contienen varios tipos de células y, por ello, es posible que existan células susceptibles a infección y otras que sean resistentes.

Para que un virus pueda multiplicarse in vitro es preciso, primero, contar con un cultivo celular que proporcione las condiciones necesarias para la actividad vírica y en el que se pueda examinar la morfología celular.

El crecimiento de un virus en un cultivo celular puede determinarse por varios métodos, entre ellos se encuentran los siguientes:

- Llevando a cabo pruebas de infectividad en varios sistemas hospedadores con muestras del líquido de cultivo, de las células o de ambos componentes.
- Investigaciones citopatológicas.
- Estudios de metabolismo celular.
- Reacción de hemoaglutinación.
- Pruebas serológicas.
- Microscopía.

La infección vírica de las células puede ser evaluada cuantitativamente por:

- Efectos citopáticos, observados mediante microscopía.
- Falta de actividad metabólica, evidenciada por la ausencia de cambios de pH en el medio.
- Producción de placas líticas en cultivos preparados para este fin.

## **MATERIAL**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

- 1 Botella de cultivo con monocapa celular confluyente
- Suspensión viral de Newcastle (el obtenido en prácticas anteriores y/o vacuna).

### **EQUIPO**

- Microscopio de campo invertido

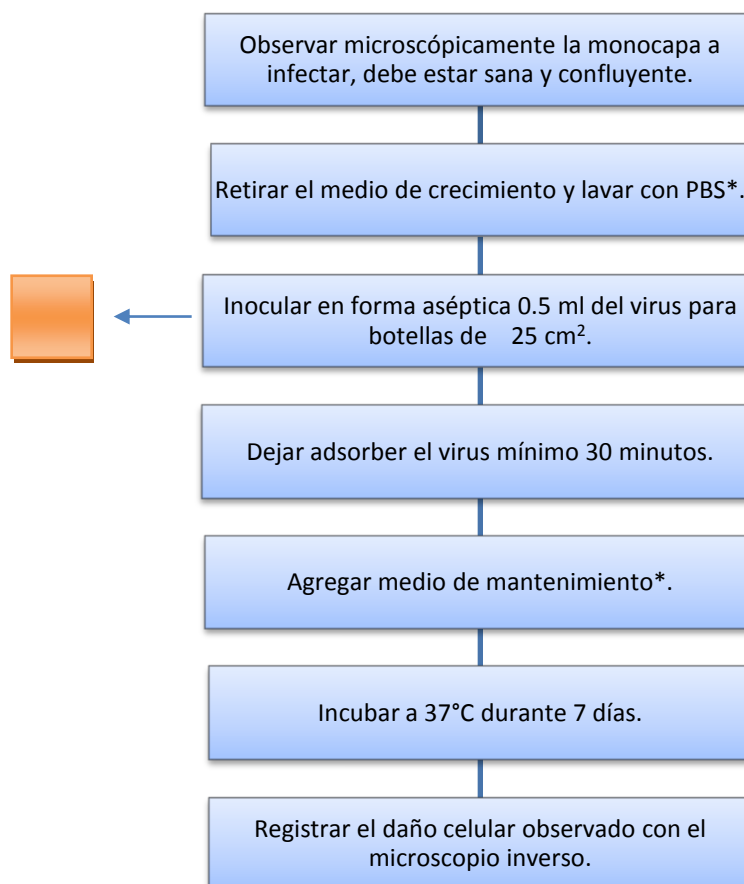
### **SOLUCIONES**

- PBS
- Medio de mantenimiento

### **OTROS**

- 1 Pipeta de 1ml estéril
- 1 Frasco para desecho
- Mechero

## PROCEDIMIENTO



\*Ver anexo No 3 para preparación de medios utilizados.  
Nota: Incluir cultivos no inoculados como control.



## REFERENCIAS

- CUNNINGHAM, Charles. (1971). **VIROLOGÍA PRÁCTICA**. 6a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 82-93.
- LLOP, Hernández et al. (2001). **MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICAS**. Tomo II. Ed. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. pp. 17,57.
- [www.virologia.fcien.edu.uy/images](http://www.virologia.fcien.edu.uy/images)

## PRACTICA No 11

### CONGELACIÓN DE CÉLULAS

#### Objetivo:

Congelar células provenientes de un cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo a  $-196^{\circ}\text{C}$  utilizando nitrógeno líquido con la finalidad de conservar su morfología para estudios posteriores.

#### INTRODUCCIÓN

Cuando las células se mantienen a baja temperatura, su metabolismo disminuye y por lo tanto no requieren pase celular.

A temperaturas extremadamente bajas se inhibe el proceso destructivo y el metabolismo celular, es decir las células se mantienen en un estado de animación suspendida.

El mejor procedimiento para preservar y prolongar la viabilidad de células de mamíferos es almacenarlas en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).



Fig. No 11a. procedimiento de congelación con nitrógeno líquido.

En ausencia de un agente crioprotector tales como glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO) el proceso de congelación es letal en las células de mamíferos. El daño que se presenta es causado por la formación de cristales de hielo, alterando la concentración de electrólitos, cambios de pH, deshidratación y desnaturalización de proteínas.

Algunos procedimientos que ayudan a disminuir los daños en la célula se numeran a continuación:

- 1.- Adición de glicerol o DMSO para disminuir el punto de congelación y proteger a la membrana de una posible ruptura.

2.- Someter las células a refrigeración para permitir que el agua dentro de las células salga de estas antes de la congelación.

3.- Almacenar las células a  $-130^{\circ}\text{C}$  retrasa la formación de cristales.

La viabilidad celular puede ser determinada adicionando una mezcla de azul de tripan en PBS. Las células muertas se tiñen de azul mientras que las vivas no se tiñen. Las células vivas tienen la habilidad de excluir el azul de tripan. Dividiendo el número de células vivas entre el total de células presentes se obtiene el porcentaje de células que sobreviven al procedimiento.

## **MATERIAL**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

- 1 botella de cultivo con monocapa de células confluyente

### **EQUIPO**

- Centrífuga
- Balanza de dos platos
- Refrigerador

### **SOLUCIONES**

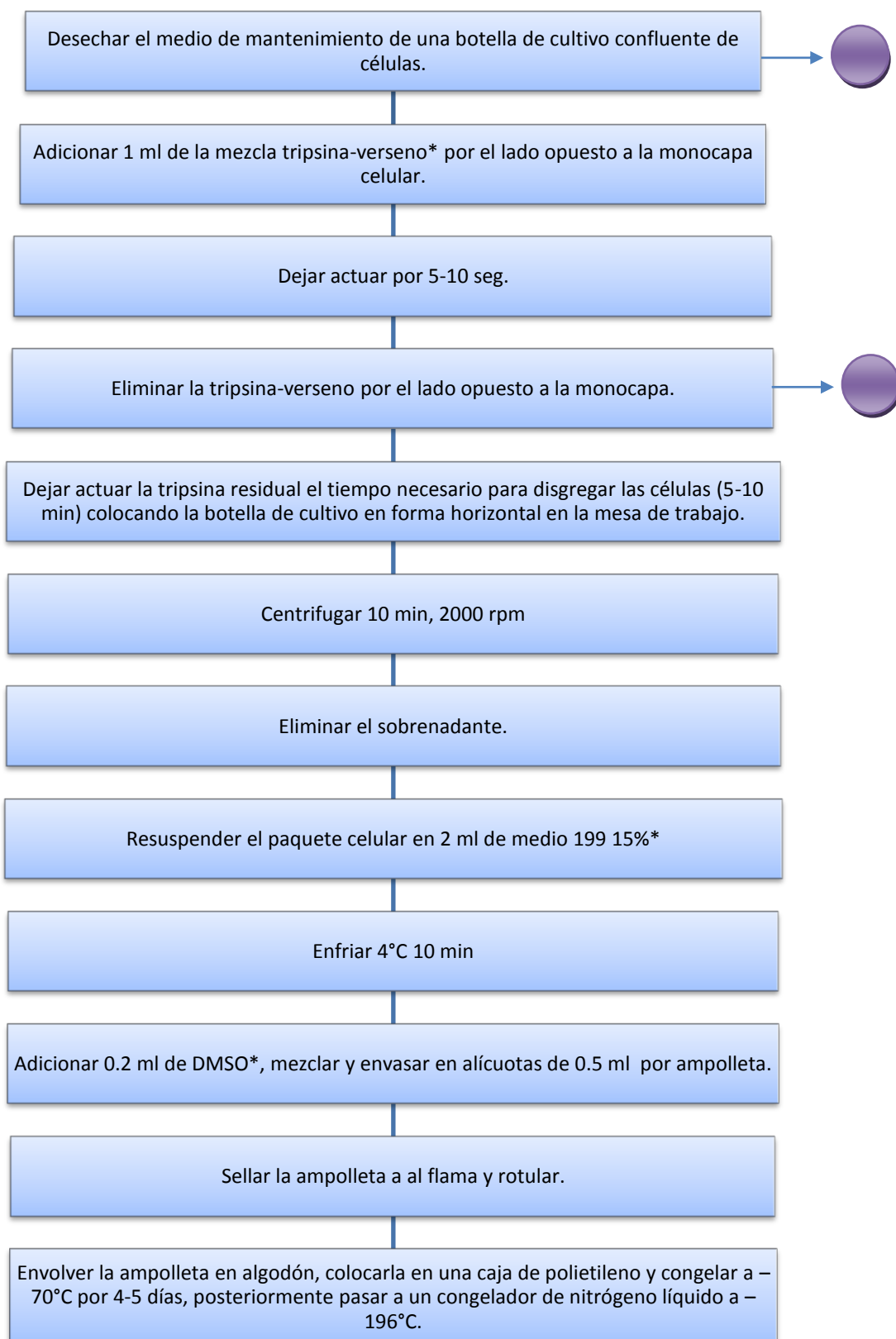
- Mezcla de tripsina-verseno
- Medio 199 15%
- DMSO o glicerol 5-15%
- Nitrógeno líquido

### **OTROS**

- 1 frasco para desecho
- 3 pipetas de 1 ml
- Tubos para centrífuga
- 1 pipeta de 2 ml
- Mechero
- Algodón
- Caja de polietileno



## PROCEDIMIENTO



\*Ver anexo No 3 para preparación de medios utilizados.





## **ANEXO No 1**

### **SUGERENCIA DE COMO REALIZAR UN REPORTE DE LABORATORIO A MANERA DE ARTÍCULO**

El formato para un reporte escrito debe de incluir los siguientes puntos:

- 1) Título
- 2) Resumen
- 3) Introducción
- 4) Protocolo experimental
- 5) Resultados
- 6) Discusión
- 7) Referencias
- 8) Tablas
- 9) Figuras

#### **1) TITULO**

El título debe de ser claro e informativo para que refleje el contenido del trabajo. El título debe ser conciso e incluir el nombre de la muestra biológica en estudio.

#### **2) RESUMEN**

Cada reporte debe de comenzar con un breve resumen (abstract / summary) de más de 200 palabras, que presente claramente el objetivo del trabajo (1 ó 2 enunciados), los procedimientos utilizados en la investigación, y todos los resultados obtenidos más significativos.

#### **3) INTRODUCCIÓN**

La introducción debe de establecer el propósito u objetivo de la investigación, los aspectos teóricos y fundamentos involucrados en los experimentos. También debe de incluir descripciones de los sistemas biológicos y químicos.

#### **4) PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

En este apartado se debe incluir la metodología en forma completa de forma que los experimentos puedan ser reproducidos por alguien más.

#### **5) RESULTADOS**

La recolección de datos en los experimentos puede ser presentada como tablas o figuras. Los resultados experimentales pueden ser descritos en el texto sin la necesidad de tablas o figuras.

#### **6) DISCUSIÓN**

La sección de la discusión debe de coincidir con la interpretación de los resultados. También se debe indicar que resultados se esperaban. Si los resultados obtenidos son diferentes a los

resultados que se esperaban, se deben de explicar los factores que pudieron influir en los mismos.

#### 7) REFERENCIAS

Las referencias pueden ser citadas dentro del texto de dos formas, como en los ejemplos siguientes:

- a) “Los métodos para la preparación ya fueron descritos (1)”.
- b) “Los métodos para la preparación ya fueron descritos (Smith and Jones, 1991).”

La forma correcta de escribir las referencias es la siguiente:

- a) Smith, A., and Jones C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 123-128.
- b) Brachet, J. (1967) in *Comprehensive Biochemistry* (Florkin, M., and Stotz, E. M., eds), Vol. 28, pp. 23-54, Elsevier, Amsterdam.
- c) LITTER, Manuel, Manual de Farmacología, 4ª ed, El Ateneo, Argentina, 1988, pp. 259, 263
- d) RANGEL, Trujano Lidia, Tesis Profesional: Estudio Comparativo de los Efectos Adversos Producidos en Ratas Wistar Blancas por dos Compuestos Contraceptivos Inyectables de Uso Comercial en México, FES-Cuautitlan, México, 1988, pp. 39-47.

#### 8) TABLAS

Cada tabla debe ser numerada (por ejemplo: Tabla 1), un título descriptivo de la tabla y un breve párrafo dando suficientes detalles acerca del experimento sin requerir el texto.








#### 9) FIGURAS

Cada figura debe ser numerada (por ejemplo: Figura 1) y acompañada por una leyenda la cual debe incluir un título y una pequeña explicación.

## ANEXO No 2

## TRATAMIENTO DE RESIDUOS

**TABLA A. TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN FINAL DE RESIDUOS GENERADOS EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA MÉDICA.**

TIPO DE RESIDUO	SÍMBOLO UTILIZADO	RECOLECCIÓN	TRATAMIENTO	DISPOSICIÓN FINAL
BIOLÓGICOS INFECCIOSOS		EN BOLSAS DE POLIETILENO COLOR AMARILLO Y CON EL SÍMBOLO UNIVERSAL DE RPBI	INCINERACIÓN (FES CUAUTITLÁN CAMPO 4)	BASURERO MUNICIPAL
PUNZOCORTANTES		RECIPIENTE RÍGIDO DE POLIETILENO COLOR ROJO Y CON EL SÍMBOLO UNIVERSAL DE RPBI	INCINERACIÓN (FES CUAUTITLÁN CAMPO 4)	BASURERO MUNICIPAL
BIOLÓGICOS NO INFECCIOSOS		SERÁN ENVUELTOS EN PAPEL Y RECOLECTADOS EN BOLSAS DE PLÁSTICO COMUNES		BASURERO MUNICIPAL
MATERIAL REUTILIZABLE INFECCIOSO		RECIPIENTE RÍGIDO DE POLIETILENO COLOR ROJO Y CON EL SÍMBOLO UNIVERSAL DE RPBI	INACTIVACIÓN EN AUTOCLAVE 121°C/15lb/15min. LAVADO NORMAL DEL MATERIAL	ALMACENAR EN INTERLABORATORIO CORRESPONDIENTE A LA MATERIA.
MATERIAL REUTILIZABLE NO INFECCIOSO		RECIPIENTE RÍGIDO MARCADO COMO MATERIAL SUCIO	LAVADO NORMAL	ALMACENAR EN INTERLABORATORIO CORRESPONDIENTE A LA MATERIA.
MATERIAL DESECHABLE INFECCIOSO		EN BOLSAS DE POLIETILENO COLOR ROJO Y CON EL SÍMBOLO UNIVERSAL DE RPBI	INACTIVACIÓN EN AUTOCLAVE 121°C/15lb/15min.	BASURERO MUNICIPAL
MATERIAL DESECHABLE NO INFECCIOSO		BOLSAS DE PLÁSTICO COMUNES		BASURERO MUNICIPAL
SUSTANCIAS QUÍMICAS				

La tabla No 1 de este anexo fue elaborada en base a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

**NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.  
(RESUMEN)**

### **3. Definiciones y terminología**

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana, se consideran las definiciones contenidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, su Reglamento en materia de Residuos Peligrosos, la Ley General de Salud, sus Reglamentos, y las siguientes:

#### **3.1 Agente biológico-infeccioso**

Cualquier microorganismo capaz de producir enfermedades cuando está presente en concentraciones suficientes (inóculo), en un ambiente propicio (supervivencia), en un hospedero susceptible y en presencia de una vía de entrada.

#### **3.2 Agente enteropatógeno**

Microorganismo que bajo ciertas circunstancias puede producir enfermedad en el ser humano a nivel del sistema digestivo, se transmite vía oral-fecal.

#### **3.3 Bioterio**

Es un área o departamento especializado en la reproducción, mantenimiento y control de diversas especies de animales de laboratorio en óptimas condiciones, los cuales son utilizados para la experimentación, investigación científica y desarrollo tecnológico.

#### **3.6 Cepa**

Cultivo de microorganismos procedente de un aislamiento.

#### **3.7 Establecimientos generadores**

Son los lugares públicos, sociales o privados, fijos o móviles cualquiera que sea su denominación, que estén relacionados con servicios de salud y que presten servicios de atención médica ya sea ambulatoria o para internamiento de seres humanos y utilización de animales de bioterio, de acuerdo con la tabla 1 del presente instrumento.

#### **3.9 Manejo**

Conjunto de operaciones que incluyen la identificación, separación, envasado, almacenamiento, acopio, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

#### **3.10 Muestra biológica**

Parte anatómica o fracción de órganos o tejido, excreciones o secreciones obtenidas de un ser humano o animal vivo o muerto para su análisis.

#### **3.11 Órgano**

Entidad morfológica compuesta por la agrupación de tejidos diferentes que concurren al desempeño de un trabajo fisiológico.

**3.12 Prestador de servicios**

Empresa autorizada para realizar una o varias de las siguientes actividades: recolección, transporte, acopio, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos biológico-infecciosos.

**3.13 Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI)**

Son aquellos materiales generados durante los servicios de atención médica que contengan agentes biológico-infecciosos según son definidos en esta Norma, y que puedan causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

**3.18 Tejido**

Entidad morfológica compuesta por la agrupación de células de la misma naturaleza, ordenadas con regularidad y que desempeñan una misma función.

**3.19 Tratamiento**

El método físico o químico que elimina las características infecciosas y hace irreconocibles a los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

**4. Clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos**

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana se consideran residuos peligrosos biológico-infecciosos los siguientes:

**4.1.1** La sangre y los componentes de ésta, sólo en su forma líquida, así como los derivados no comerciales, incluyendo las células progenitoras, hematopoyéticas y las fracciones celulares o acelulares de la sangre resultante (hemoderivados).

**4.2** Los cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos.

**4.2.1** Los cultivos generados en los procedimientos de diagnóstico e investigación, así como los generados en la producción y control de agentes biológico-infecciosos.

**4.2.2** Utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos.

**4.3** Los patológicos

**4.3.1** Los tejidos, órganos y partes que se extirpan o remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención quirúrgica, que no se encuentren en formol.

**4.3.2** Las muestras biológicas para análisis químico, microbiológico, citológico e histológico, excluyendo orina y excremento.

**4.3.3** Los cadáveres y partes de animales que fueron inoculados con agentes enteropatógenos en centros de investigación y bioterios.



#### 4.4 Los residuos no anatómicos

Son residuos no anatómicos los siguientes:

**4.4.1** Los recipientes desechables que contengan sangre líquida.

**4.4.2** Los materiales de curación, empapados, saturados, o goteando sangre o cualquiera de los siguientes fluidos corporales: líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido Céfal-Raquídeo o líquido peritoneal.

**4.4.3** Los materiales desechables que contengan esputo, secreciones pulmonares y cualquier material usado para contener éstos, de pacientes con sospecha o diagnóstico de tuberculosis o de otra enfermedad infecciosa según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o el Boletín Epidemiológico.

**4.4.4** Los materiales desechables que estén empapados, saturados o goteando sangre, o secreciones de pacientes con sospecha o diagnóstico de fiebres hemorrágicas, así como otras enfermedades infecciosas emergentes según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o el Boletín Epidemiológico.

#### 4.5 Los objetos punzocortantes

**4.5.1** Los que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el diagnóstico y tratamiento, únicamente: tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estiletes de catéter, excepto todo material de vidrio roto utilizado en el laboratorio, el cual deberá desinfectar o esterilizar antes de ser dispuesto como residuo municipal.

### **5. Clasificación de los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos**

**5.1** Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana, los establecimientos generadores se clasifican como se establece en la tabla 1.

**TABLA No.1**

<b>NIVEL I</b>	<b>NIVEL II</b>	<b>NIVEL III</b>
Unidades hospitalarias de 1 a 5 camas e instituciones de investigación con excepción de los señalados en el Nivel III. Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis de 1 a 50 muestras al día. Unidades hospitalarias. Unidades hospitalarias psiquiátricas. Centros de toma de muestras para análisis clínicos.	Unidades hospitalaria de 6 hasta 60 camas. Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis de 51 a 200 muestras al día. Bioterios que se dediquen a la investigación con agentes biológico-infecciosos. Establecimientos que generen de 25 a 100 kg al mes de RPBI.	Unidades hospitalarias de más de 60 camas. Centros de producción e investigación experimental en enfermedades infecciosas. Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis a más de 200 muestras al día. Establecimientos que generen más de 100 kg al mes de RPBI.

## **6. Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos**

**6.1** Los generadores y prestadores de servicios, además de cumplir con las disposiciones legales aplicables, deben:

**6.1.1** Cumplir con las disposiciones correspondientes a las siguientes fases de manejo, según el caso:

- a) Identificación de los residuos.
- b) Envasado de los residuos generados.
- c) Almacenamiento temporal.
- d) Recolección y transporte externo.
- e) Tratamiento.
- f) Disposición final.

### **6.2** Identificación y envasado

**6.2.1** En las áreas de generación de los establecimientos generadores, se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológicas infecciosas, conforme a la tabla 2 de esta Norma Oficial Mexicana. Durante el envasado, los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos.

TABLA 2

TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FISICO	ENVASADO	COLOR
4.1 Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.2 Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
4.3 Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
4.4 Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.5 Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

- a) Las bolsas deberán ser de polietileno de color rojo traslúcido de calibre mínimo 200 y de color amarillo traslúcido de calibre mínimo 300, impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, además deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (Apéndice Normativo), deberán cumplir los valores mínimos de los parámetros indicados en la tabla 3 de esta Norma Oficial Mexicana.

Las bolsas se llenarán al 80 por ciento (80%) de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas.

**6.2.2** Los recipientes de los residuos peligrosos punzocortantes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s) de ensamble seguro y cierre permanente, deberán contar con la leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico (Apéndice Normativo).

- b) Los recipientes para los residuos peligrosos punzocortantes y líquidos se llenarán hasta el 80% (ochenta por ciento) de su capacidad, asegurándose los dispositivos de cierre y no deberán ser abiertos o vaciados.

### 6.3 Almacenamiento

**6.3.1** Se deberá destinar un área para el almacenamiento temporal de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Los establecimientos generadores incluidos en el Nivel I de la tabla 1 de esta Norma Oficial Mexicana, quedan exentos del cumplimiento del punto 6.3.5 y podrán ubicar los contenedores

a que se refiere el punto 6.3.2 en el lugar más apropiado dentro de sus instalaciones, de manera tal que no obstruyan las vías de acceso.

**6.3.2** Los residuos peligrosos biológico-infecciosos envasados deberán almacenarse en contenedores metálicos o de plástico con tapa y ser rotulados con el símbolo universal de riesgo biológico, con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO-INFECCIOSOS".

**6.3.3** El periodo de almacenamiento temporal estará sujeto al tipo de establecimiento generador, como sigue:

- (a) Nivel I: Máximo 30 días.
- (b) Nivel II: Máximo 15 días.
- (c) Nivel III: Máximo 7 días.

**6.3.4** Los residuos patológicos, humanos o de animales (que no estén en formol) deberán conservarse a una temperatura no mayor de 4°C (cuatro grados Celsius), en las áreas de patología, o en almacenes temporales con sistemas de refrigeración o en refrigeradores en áreas que designe el responsable del establecimiento generador dentro del mismo.

## **6.5 Tratamiento**

**6.5.1** Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos y deben hacerse irreconocibles para su disposición final en los sitios autorizados.

**6.5.3** Los residuos patológicos deben ser incinerados o inhumados, excepto aquellos que estén destinados a fines terapéuticos, de investigación y los que se mencionan en el inciso 4.3.2 de esta Norma Oficial Mexicana. En caso de ser inhumados debe realizarse en sitios autorizados por la SSA.

## **6.6. Disposición final**

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos tratados e irreconocibles, podrán disponerse como residuos no peligrosos en sitios autorizados por las autoridades competentes.

## ANEXO No 3

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

## COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DMEM

(Medio MEM modificado por Dulbecco: con glucosa elevada, con L-glutamina y sin piruvato de sodio)

COMPONENTE	mg/L
Arginina	84
Cisteína	56.8
Glutamina	584
Glicina	30
Histidina	42
Isoleucina	104.8
Leucina	104.8
Lisina	146.2
Metionina	30
Fenilalanina	66
Serina	42
Treonina	95.2
Triptófano	16
Tirosina	72
Valina	93.6
Pantotenato	4
Colina	4
Ácido fólico	4
Inositol	7
Nicotinamida	4
Ácido aminobenzoico	4
Riboflavina	0.4
Tiamina	4
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	264
KCl	400
MgSO <sub>4</sub>	200
NaCl	6.4
Fosfatos	141.3
Glucosa	4.5
Piruvato	110
Rojo de fenol	15

A este medio se la añade bicarbonato sódico 15 a 20 mM.

### ALGUNOS COMPONENTES DEL SFB (Suero Fetal Bovino)

Componente	mM
Cloro	540.000,0
Sodio	134.000,0
Potasio	11.948,0
Glucosa	9.2
Urea	6.0
Calcio	3.4
Proteína total	2.5
Albúmina	1.6
	<b>mM x 10<sup>-3</sup></b>
Colesterol	970
Fósforo	600
Triglicéridos	460
Creatinina	228
Ácido úrico	166
Vitamina C	50
Hierro	35
Bilirrubina	12
Vitamina E	5.3
Glutación reducido	4.8
Disulfuros (cys)	2.5
Lipoproteína	1.2
Glutación oxidado	0.4
Hemoglobina	0.3
	<b>mM x 10<sup>-6</sup></b>
Cobre	4.650,0
Vitamina A	700
Selenio	830
T <sub>4</sub>	158
Cortisol	33
Prolactina	0.1
	<b>mM x 10<sup>-9</sup></b>
Prostaglandina F	60
Prostaglandina E	40
T <sub>3</sub>	2.1
GH	1.5
FSH	1.0
Progesterona	0.5
PTH	0.3
TSH	0.1

Estos datos son un ejemplo de la complejidad del medio interno fisiológico en el que viven normalmente las células animales. Existen otros componentes que no se mencionan tales como factores de crecimiento y otros que se desconocen.

### SOLUCIÓN DE ALSEVER

Dextrosa	20.50 g
Citrato sódico	8.0 g
Ácido cítrico	0.55 g
NaCl	4.2 g
Agua destilada	1000 ml

- 1) Pesar y disolver cada componente en el orden citado.
- 2) Envasar en volúmenes de 50 ó 100 ml.
- 3) Esterilizar en autoclave a 2/3 de atmósfera por 10 minutos.
- 4) Guardar a 4°C.

### MEDIO 199 o WAYMOUTH\* (medio muy utilizado para cultivo de células)

Agua destilada estéril	450 ml
Medio 10x	50 ml
Bicarbonato de sodio	30 ml
Buffer HEPES	10 ml
Glutamina	10 ml
Penicilina/estreptomicina	10 ml
SFB	25 ml

\* Datos provenientes del fabricante.

### BICARBONATO DE SODIO 7.5 %

- 1.- Adicionar 7.5 g de bicarbonato de sodio para cultivo celular a 100 ml de agua y agitar hasta disolverlo.
- 2.- Esterilizar en autoclave 15-20 minutos.
- 3.- Almacenar a temperatura ambiente.

**Buffer HEPES (Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico) 1.0 M peso molecular 238.31**

- 1.- Adicionar 23.8 g de HEPES a 100 ml de agua destilada y mezclar hasta disolverlo.
- 2.- Esterilizar en autoclave 15-20 minutos.
- 3.- Almacenar a temperatura ambiente.

**GLUTAMINA (200 mM) peso molecular 146.15**

- 1.- Adicionar 2.92 g de glutamina a 100 ml de agua destilada hasta disolverla.
- 2.- Esterilizar por filtración 50 ml en una botella de capacidad de 100ml
- 3.- Congelar colocando la botella inclinada ya que las soluciones de glutamina se expanden y pueden romper el recipiente que las contiene.
- 4.- Cuando se vaya a utilizar esta solución se debe descongelar y mantener en agitación en baño maría a 50 °C hasta que la glutamina se disuelva, después se debe mantener en refrigeración.

**PENICILINA/ESTREPTOMICINA**

- 1.- Adicionar 0.63 g de penicilina-G y 1 g de sulfato de estreptomicina a 100 ml de agua destilada y mezclar hasta disolver.
- 2.- Filtrar por esterilización en botellas de 100 ml.
- 3.- Almacenar en congelación.
- 4.- Cuando se emplee la solución, descongelar durante toda una noche manteniendo en refrigeración.



**SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA (SSF)**

NaCl	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

- 1) Depositar el NaCl en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml.
- 2) Agregar 250 ml de agua destilada y agitar hasta que se disuelva el NaCl por completo.
- 3) Aforar a 1000 ml con agua destilada.
- 4) Distribuir en frascos de 250 ml.
- 5) Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- 6) Dejar enfriar y etiquetar.
- 7) Conservar a temperatura ambiente.

**SOLUCIÓN DE PBS 0.1 M pH= 7.2****Solución A**

Disolver 27.6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  monohidratado en agua destilada llevando a 1000 ml de aforo.

**Solución B**

Disolver 53.6 g de  $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada y aforar a 1000ml.

\*Tomar 140 ml de la solución A y mezclar con 360 ml de la solución B llevar a 500 ml de aforo.

## ANEXO No 4

### DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

- Sacar el criotubo del Nitrógeno líquido y colocarlo rápidamente en agua a temperatura ambiente.
- Bajo cámara de bioseguridad, abrir la ampolla o el criotubo y depositar la suspensión celular en una botella de 25 cm<sup>2</sup>.
- Agregarle a la botella unos 5 ml de medio de crecimiento y colocarlo a 37°C para que crezcan las células.
- Cambiarle el medio de cultivo a las 24 horas si es necesario para quitar el DMSO, volver a incubar y observar el crecimiento. El índice de recuperación varía con el tipo de célula.

## ANEXO No 5

## CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS

## DESOXIRRIBOVIRUS o DNA VIRUS

<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>POXVIRIDAE</b>	Orthopoxvirus	Virus vaccinia Viruela
	Parapoxvirus	Virus Orf Nódulo del lechero
	Yatapoxvirus	Virus Yaba y Tanapox
	Moluscipoxvirus	Molusco contagioso
<b>HERPESVIRIDAE</b>	Virus Simplex	Herpesvirus tipo 1 Herpesvirus tipo 2
	Varicelavirus	Varicela-Zoster
	Citomegalovirus	Citomegalovirus
	Roseolovirus	Linfotropico B Herpesvirus tipo 7
	Linfocryptovirus	Epstein-Barr
<b>HEPADNAVIRIDAE</b>	Orthoepadnavirus	Hepatitis B
<b>ADENOVIRIDAE</b>	Mastadenovirus	Adenovirus
<b>PAPOVAVIRIDAE</b>	Papillomavirus	Papilomavirus
	Poliomavirus	BK JC
<b>PARVOVIRIDAE</b>	Parvovirus	B19 RA-1

**RIBOVIRUS o RNA VIRUS**

<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>REOVIRIDAE</b>	Orthoreovirus Coltivirus Orbivirus Rotavirus	Reovirus Fiebre del Colorado Virus keremovo Rotavirus humano
<b>TOGAVIRIDAE</b>	Alfavirus	Virus de la Encefalitis Equina Virus Sindbis Virus Semlikicelda 3
	Rubivirus	Rubéola
<b>FLAVIVIRIDAE</b>	Flavivirus	Encefalitis de San Luis Encefalitis Japonesa Encefalitis Valle de Murria Fiebre amarilla Dengue Fiebre del Nilo Virus de Kyasanur Fiebre Hemorrágica Omsk Encefalitis Europea
	Hepacivirus	Hepatitis C
<b>CORONAVIRIDAE</b>	Coronavirus	Coronavirus
<b>PARAMIXOVIRIDAE</b>	Paramixovirus	Parainfluenza Parotiditis
	Morbilivirus	Sarampión
	Pneumovirus	Virus Respiratorio Sincial
<b>FILOVIRIDAE</b>	Filovirus	Virus Ébola Virus Marbug
<b>RHABDOVIRIDAE</b>	Vesiculovirus	Estomatitis vesicular
	Lyssavirus	Rabia
<b>ORTHOMIXOVIRUS</b>	Influenzavirus	Influenza A Influenza B Influenza C

### LÍNEAS CELULARES DE INTERÉS EN VIROLOGÍA

Línea	Especie	Tejido	Tipo
3T3	Ratón	Embrión	Fibroblástica
BHK	Hámster	Riñón	Fibroblástica
CHO	Hámster	Ovario	Epitelial
HELA	Humana	Cerviz	Linfoblástica
W138	Humana	Piel	Epitelial
BK	Mono	Riñón	Fibroblástica
HEL	Humana	Pulmón	Fibroblástica
VERO	Mono	Riñón	Fibroblástica
EPC	Carpa	Epitelio	Epitelial
HEK	Humana	Riñón	Fibroblástica
RK	Conejo	Riñón	Fibroblástica
CHSE	Salmón	Embrión	Epitelial Fibroblástica
RTG	Trucha	Riñón	

**REFERENCIAS**

- BURTON, Zachary F. (1997). **EXPERIMENTS IN MOLECULAR BIOLOGY: BIOCHEMICAL APPLICATIONS**. Academic Press. U.S.A. pp.13-15.
- COLL, Morales Julio. (1993). **TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN VIROLOGÍA**. Ediciones Díaz de Santos. España. pp.145, 151-152.
- CUNNINGHAM, Charles H. (1971). **VIROLOGÍA PRACTICA**. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp.145.
- GOLDSTEIN, Gerald. (1992). **INTRODUCTORY EXPERIMENTS IN VIROLOGY**. Wm. C. Brown Publishers. U.S.A. pp.34-35.

## DISCUSIÓN

En México, actualmente las enfermedades virales tienen gran importancia médica, dentro de las que se pueden mencionar las siguientes:

- El cáncer cérvico uterino que es causado por el Virus del Papiloma Humano y es una de las principales causas de muerte de mujeres en edad reproductiva.
- Los cuadros diarreicos agudos en lactantes que en su mayoría son producidos por el rotavirus o virus semejantes al Norwalk.
- El dengue, causado por un virus del género flavivirus, en este caso México ocupa el quinto lugar de ocurrencia en América Latina.
- El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida que es una enfermedad infecciosa causada por alguna de las variedades del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y que afecta a más de 170 mil personas en México.

Es por esto, que la enseñanza de virología es indispensable en la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo (QFB) y en muchas otras relacionadas con la salud.

Basándose en lo anterior, el programa del curso de Virología Médica que se imparte en la FES-Cuautitlán, trata de abarcar lo necesario que el alumno de la carrera de QFB debe conocer y complementa este conocimiento al poner en práctica técnicas de cultivo y diagnóstico de los virus.

Sin embargo, no contamos con información suficiente sobre Virología y mucho menos aun sobre el laboratorio de Virología Médica (entre otras) lo cual resulta muy perjudicial pues la mayoría de los alumnos que ingresan al curso no tienen antecedentes para asimilar estos nuevos conocimientos.

Conociendo esta carencia y teniendo el propósito de colaborar en resolverla, se recopiló información bibliográfica, hemerográfica y electrónica, además de contar con el apoyo de profesoras que durante un periodo considerable de tiempo han impartido la materia, para la elaboración del presente trabajo.

El Manual de Prácticas de Virología Médica ha sido elaborado para servir como una guía a estudiantes de licenciatura que por primera vez están en contacto con el campo de la Virología, ya que actualmente no se cuenta con un respaldo actualizado para este laboratorio, lo cual muchas veces impide la comprensión adecuada de los temas.

Este manual consta de 11 prácticas, cada una de las cuales cuenta con:

- Objetivo, que sirve al alumno para evaluar si adquirió o no el conocimiento o habilidad planteada.
- Material requerido para realizar la práctica.

- Procedimiento detallado de la misma contemplando el tratamiento de residuos mediante un código de símbolos que viene desglosado en el anexo.
- Referencias, en las cuales el alumno puede basarse para buscar personalmente información confiable.
- Espacio para anotaciones, ya sean resultados, análisis de resultados y/o conclusiones, según lo amerite la práctica.

También contiene un anexo, en el cual se incluye información que puede ser útil a lo largo del curso, como la preparación de reactivos, el tratamiento y disposición de residuos, entre otros.

Además se incluye el reglamento general del laboratorio, el material sugerido para la materia (de esta manera puede ser conseguido con anticipación) y una hoja de calendarización que puede ser llenada por el alumno y los profesores.



## CONCLUSIONES

Al recopilar información bibliográfica, hemerográfica y electrónica sobre Virología y temas relacionados, además de contar con la asesoría de profesoras que durante un periodo considerable de tiempo han impartido la materia, fue posible elaborar el Manual de Prácticas para el Laboratorio de Virología Médica.

Ahora, el alumno puede contar con información confiable en forma de manual para mejorar la comprensión de los temas revisados en el laboratorio de esta materia.

El alumno tendrá la posibilidad de complementar esta información tomando como base las referencias citadas en este trabajo.

## REFERENCIAS GENERALES

- BURLESON, Florence G. (1992). **VIROLOGY A LABORATORY MANUAL**. Academic Press, inc. U.S.A. pp.14,15,19,25,33,86.
- BURTON, Zachary F. (1997). **EXPERIMENTS IN MOLECULAR BIOLOGY: BIOCHEMICAL APPLICATIONS**. Academic Press. U.S.A. pp.13-15.
- CARBALLAL Guadalupe, Oubiña, José. (1998) **VIROLOGÍA MEDICA**. 3ra ed. Ed. Librería el Ateneo. Buenos Aires. pp 15-17.
- Centers for Disease Control and Prevention. **AVIAN INFLUENZA, INFECTIONS IN HUMANS** (2005).
- CLASSEN-LINKE, M. Kusche, R. Knauth and H.M. Beier. **ESTABLISHMENT OF A HUMAN ENDOMETRIAL CELL CULTURE SYSTEM AND CHARACTERIZATION OF ITS POLARIZED HORMONE RESPONSIVE EPITHELIAL CELLS**. Cell Tissue Res **287** (1997), pp. 171–185.
- COLL, Morales Julio. (1993). **TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN VIROLOGÍA**. Ediciones Díaz de Santos. España. pp.145, 151-152.
- CUNNINGHAM, Charles. (1971). **VIROLOGÍA PRÁCTICA**. 6a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 57-68,82-93,92,93,100-103,133-135,139,145.
- CUMMING, Hamish. (1975). **VIROLOGÍA CULTIVO DE TEJIDOS**. Ed. El Manual Moderno. México. pp. 27-35, 37-42.
- DEL BARRIO, Alonso Gloria.(1997). **VIROLOGÍA**. Instituto Politécnico Nacional. México, 1997, pp.5, 12.
- D.J. Alexander. **NEWCASTLE DISEASE AND OTHER AVIAN PARAMYXOVIRIDAE INFECTION**. DISEASES OF POULTRY. 10th ed., (1997), pp. 541–569.
- FLEMING, O. Diane.(2006). **BIOLOGICAL SAFETY: PRINCIPLES AND PRACTICES**. 4ª ed, ASM Press. U.S.A. pp.489-490, 542-543
- FRESHNEY, R. I. (1986). **ANIMAL CELL CULTURE, A PRACTICAL APPROACH**. Ed. IRLPRESS. Oxford, Washington D. C. pp. 3-11,13,28,46,71-78,371,373.
- GOLDSTEIN, Gerald. (1992). **INTRODUCTORY EXPERIMENTS IN VIROLOGY**. Wm. C.Brown Publishers, U.S.A. pp.34,35,51,53,89.
- H. TAKAHASHI, K. Iga, T. Sato, M. Takahashi and A. Okano. **ISOLATION AND CULTURE OF BOVINE ENDOMETRIAL EPITHELIAL CELLS IN A SERUM-FREE CULTURE SYSTEM**. *J Reprod Dev* **47** (2001), pp. 181–187.

- KILLAN ML. **HEMAGGLUTINATION ASSAY FOR THE AVIAN INFLUENZA VIRUS**. Avian viruses Section, Diagnostic Virology Laboratory, National Veterinary Services Laboratories, US Department of Agriculture (2008) 436:47-52.
- LENNETTE, Edwin H., et.al. (1979). **DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR VIRAL, RICKETTSIAL AND CHLAMYDIAL INFECTIONS**. 5a ed. American Public Health Association. Washington, DC. pp.655-657.
- LIBIA, Herrero Uribe. (2004). **PROCEDIMIENTOS EN VIROLOGÍA MÉDICA**. Ed. Univesidad de Costa Rica. México. pp. 3-13,19-21,27-46,38-50,98-104,190,145,146.
- LLOP, Hernández, Alina. (2001). **MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICAS**. Tomo II, Edit. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. pp. 16-19, 20,57.
- MANUAL DE LA OIE SOBRE ANIMALES TERRESTRES. (2004),pp. 998-1001
- MERCHANT, I.A. (1980). **BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA VETERINARIAS**. 3a ed. Ed. Acribia. España. pp. 585-589,611-619,629-632,695-697.
- MORENO, Chan, Ricardo. **LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE Y ALGUNOS AVANCES RECIENTES DE DIAGNÓSTICO**. CIENCIA VETERINARIA. Lab de microbiología experimental. Departamento de medicina y zootecnia. Unam. Mexico DF.
- R.G. Giffard, Y.-B. Ouyang. [CELL CULTURE: PRIMARY NEURAL CELLS](#). Encyclopedia of Neuroscience (2009). Pages 633-637.
- SMITH, K.M. **INTRODUCTION TO VIROLOGY**. Science Paperbacks. U.S.A. pp.3-4.
- XIAOXIA LI, Tongjie Chai, Zhiliang Wang, Cuiping Song, Hongjing Cao, Jingbo Liu, Xingxiao Zhang, Wei Wang, Meiling Yao, Zengmin Miao. **OCCURRENCE AND TRANSMISSION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS AEROSOL ORIGINATING FROM INFECTED CHICKENS UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS**. Veterinary Microbiology, **In Press, Corrected Proof**, Available online 11 November (2008).
- [www.ceniap.gov.ve/pdf/revistastecnicas/ceniaphoy/articulos](http://www.ceniap.gov.ve/pdf/revistastecnicas/ceniaphoy/articulos)
- [www.imbiomed.com](http://www.imbiomed.com)
- [www.viarural.com.ar/viarural.com.or/ganadería/aves/enfermedades/newcastle](http://www.viarural.com.ar/viarural.com.or/ganadería/aves/enfermedades/newcastle).
- [www.avicultura.com.mx/articulos/sanidad/images](http://www.avicultura.com.mx/articulos/sanidad/images)
- [www.virologia.fcien.edu.uy/images](http://www.virologia.fcien.edu.uy/images)
- <http://www.tissuedissociation.com/techniques.html>