



PROGRAMA DE PRACTICAS DE VIROLOGÍA

I. IDENTIFICACIÓN DEL CURSO

ORGANISMO ACADÉMICO: FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA									
Programa Educativo: MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA					Área de docencia: SALUD PUBLICA				
Aprobación por los H. H. Consejos Académico y de Gobierno			Fecha: 17/07/2013		Programa elaborado: M. en C. MVZ. Lemuel León Lara Revisado M. en C. Lemuel León Lara M en C. Trinidad Beltrán León			Fecha de elaboración: 10/02/05 Fecha de revisión: 16/ 06/ 2013	
Clave	Horas de teoría	Horas de práctica	Total de horas	Créditos	Tipo de Unidad de Aprendizaje	Carácter de la Unidad de Aprendizaje	Núcleo de formación	Modalidad	
L43731	64 (4)	32 (2)	96 (6)	10	Curso	Obligatoria	Sustantivo	Presencial	
Prerrequisitos (conocimientos previos): Bioquímica Biología celular Inmunología			Unidad de Aprendizaje Antecedente: Ninguna			Unidad de Aprendizaje Consecuente: Patología general Temas selectos de salud pública Medicina preventiva Epidemiología			
Programas educativos en los que se imparte: Medicina Veterinaria y Zootecnia									



PROGRAMA DE PRÁCTICAS

PRÁCTICA No. 1: BIOSEGURIDAD, MEDIOS DE CULTIVO Y DILUCIONES.

INTRODUCCIÓN: Las medidas de seguridad que se llevan a cabo en un laboratorio se determinan dependiendo de que tipo de virus, su patogenicidad y virulencia considerando su riesgo que representan para la salud humana y animal. En el laboratorio de Virología se trabaja con material biológico específico, reactivos y soluciones todo bajo condiciones de esterilidad posibles y se realizan diluciones de material biológico a ser analizado.

OBJETIVO: El alumno conocerá las características generales de un laboratorio de Virología: medidas de protección para evitar riesgos de infección proveniente de material biológico contaminado, manejo del equipo y materiales diversos. Conocerá las características de los diferentes medios de cultivo y soluciones. Además conocerá las diferentes diluciones utilizadas en el laboratorio de virología.

TIEMPO DE DURACIÓN: Dos horas.

MATERIAL: Material de vidrio estéril: Pipetas graduadas de 10, 5, 2 y 1 ml., matraces de 250 ml., tubos con tapón de rosca de 15x150 mm. Jeringas de 1 ml. para tuberculina, micropipetas, multipipetas, bombillas de seguridad, puntas de plástico estériles, placas de 24 y 96 pozos, agitador Vortex, gradillas y mechero. Soluciones y medios de cultivo estériles. Pizeta con alcohol al 70%, toallas absorbentes, probeta con solución de hipoclorito de sodio al 2%.

MÉTODO:

Se integran grupos de seis personas.



Se presentará y describirá el equipo, material y soluciones de trabajo. Dará a conocer y explicará las diluciones que se utilizan en Virología para infectar un animal de laboratorio, embrión de pollo o línea celular. Aprenderá a manejar el material bajo condiciones de esterilidad.

Realizarán diluciones dobles y logarítmicas en microplaca y en tubo respectivamente, utilizando el mezclador de tubos o bombilla de bioseguridad. Se procederá a realizar diluciones de la muestra en el diluyente estéril. Se señalará que diluciones son las apropiadas en casos específicos para la inoculación en el sistema hospedador susceptible, como el ratón de laboratorio, embrión de pollo o cultivo celular.

RESULTADOS: Preparación de diluciones dobles y diluciones logarítmicas.

EVALUACIÓN: La evaluación se realizará con base en lo siguiente:

Uso del equipo personal de bioseguridad. Comportamiento adecuado durante la práctica, participación y respuesta a preguntas realizadas durante la práctica, además de entregar el reporte de la práctica.

PREGUNTAS COMPLEMENTARIAS

Mencionar las medidas de bioseguridad personales necesarias en un laboratorio de Virología.

Características de los medios de cultivo que se utilizan en Virología.

Esquematisar las diluciones seriadas y diluciones logarítmicas.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Dilución: Disminuir la concentración de un principio activo ante un diluyente en forma sistemática.



PRÁCTICA No. 2: HEMOAGLUTINACIÓN EN MICROPLACA.

INTRODUCCIÓN: Fenómeno descrito por primera vez por Hirst en 1941, quién observó en un embrión de pollo la aglutinación de los glóbulos rojos en un vaso sanguíneo roto mientras realizaba pases de virus de la influenza en el líquido alantoideo. Hirst reconoció la importancia de este hallazgo y describió la hemaglutinación como un método para el estudio de virus. Actualmente se conoce un gran número de virus con propiedades hemaglutinantes clasificados en diferentes familias virales.

OBJETIVO: Demostrar la propiedad que tienen algunos virus de aglutinar eritrocitos, lectura e interpretación de la prueba

TIEMPO DE DURACIÓN: Sesión de dos horas.

MATERIAL: Centrifuga clínica 5000 rpm, tubos con tapón de rosca estériles de 13x100 mm, pipetas de 10 ml., matraz de 250 ml., jeringas de 10 ml con aguja, microplaca de 96 pozos fondo en “U”, multipipeta de 12 canales de 100 µl., microplaca de 50-100 µl., reloj marcador de tiempo. Anticoagulante Alsever 50 ml., diluyente solución salina fosfatada (PBS) estéril 250 ml., ave de 3-5 semanas de edad. Frasco con alcohol al 70%, toallas absorbentes, recipiente con desinfectante hipoclorito de sodio al 2%.

MÉTODOLÓGÍA: Se integrarán grupos de cinco a seis personas. El instructor presentará y describirá el equipo, material y soluciones de trabajo, dará a conocer y explicará el procedimiento de la práctica, lectura final e interpretación de los resultados. Sangrar al ave utilizando el anticoagulante Alsever a partes iguales de sangre. Lavar los eritrocitos de ave tres veces a 1500 r.p.m. con PBS. Realizar una suspensión de eritrocitos al 0,5 a 0,75% en PBS. Realizar las diluciones de una suspensión viral inactivada en microplaca y solución de PBS.



RESULTADOS: Lectura e interpretación: Reacción positiva: Consiste en la formación de grumos de glóbulos rojos “aglutinados en el fondo del pozo”. Reacción negativa: Consiste en la formación de un botón o sedimento compacto en el fondo del pozo.

EVALUACIÓN: La evaluación se realizará considerando si el alumno porta equipo personal de bioseguridad, comportamiento durante la práctica, su participación ante respuesta a las preguntas generadas durante la práctica y entrega de su reporte de la práctica e interpretación de la misma.

CUESTIONARIO

Describir el fundamento de la prueba de hemoaglutinación.

Mencionar el uso y aplicaciones de la prueba.

Que otros virus poseen propiedad hemoaglutinante.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Anticoagulante: Sustancia que inhibe la coagulación de la sangre.

PRÁCTICA No. 3: INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN HI (Método beta)

INTRODUCCIÓN: La prueba de inhibición de la hemoaglutinación viral se basa en la unión de anticuerpos a la hemoaglutinina del virus, resultando en inhibición de la hemoaglutinación. Existen dos métodos para la prueba, uno se realiza con diluciones decrecientes de virus con cantidades constantes de suero (método alfa) y el otro se realiza con diluciones decrecientes del suero con cantidades constantes de virus (método beta).

OBJETIVO: Conocer el fundamento, su aplicación lectura e interpretación de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

TIEMPO DE DURACIÓN: Una sesión de dos horas.



MATERIAL: Reloj marcador, microplaca fondo en “U”, multipipeta y micropipeta de 50-100 μ l. Suspensión de eritrocitos de ave 5%, sueros de animales a titularse, antígeno estandarizado en unidades Ha, solución salina fosfatada (PBS). Pizeta con alcohol al 70%, toallas absorbentes, recipiente con solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 2%.

MÉTODO: Se integraran grupos de cinco a seis personas. El instructor describirá las características del equipo, reactivos, material y soluciones de trabajo. Explicará el procedimiento de la prueba, la lectura e interpretación de los resultados. El alumno desarrollara la prueba en base a las instrucciones dadas.

RESULTADOS: Interpretación: El punto final del suero es la más alta dilución del suero capaz de inhibir en un 100% la aglutinación de los glóbulos rojos.

El titulo de inhibición de suero: Se expresa en unidades inhibidoras de la hemoaglutinación (UIHA) y esta dado por el inverso del punto final del suero multiplicado por el número de unidades hemoaglutinantes del virus.

EVALUACIÓN: Uso del equipo personal de bioseguridad, comportamiento durante la práctica, participación, respuestas a las preguntas realizadas durante la práctica, lectura e interpretación de la prueba así como entrega del reporte de la práctica.

CUESTIONARIO

Explicara el fundamento de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

Describirá la aplicación de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Hemoaglutinina: Glicoproteína presente en la envoltura de algunos virus.



PRÁCTICA No. 4: CULTIVO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DEL NEWCASTLE

INTRODUCCIÓN: El huevo embrionado de gallina fue utilizado por primera vez en 1911 por Rous y Murphy para la propagación de un virus oncogénico de las aves. Sin embargo la técnica fue difundida hasta 1931 por Goodpasture y perfeccionada por Burneo en los siguientes 20 años. Actualmente los huevos embrionados son utilizados en la producción de vacunas y propagación de antígeno para el diagnóstico serológico.

OBJETIVO: Demostrar la replicación del virus del Newcastle e identificar el daño en el hospedador susceptible mediante la propiedad hemoaglutinante del virus de Newcastle.

TIEMPO DE DURACIÓN: Dos sesiones: cada sesión de dos horas continuas.

MATERIAL: Tubos con tapón de rosca estériles, pipetas estériles de 1ml., jeringas de 1ml. con aguja, gradilla para tubos, bolsas de plástico, bombilla de bioseguridad, ovoscopio, perforador de huevo, tijeras rectas, pinzas de disección, placa de vidrio, puntas de plástico, lápiz marcador. Solución salina fosfatada (PBS), resistol blanco (sellador), Embrión de pollo libre de patógenos específicos de preferencia, suspensión de virus del Newcastle, suspensión de eritrocitos al 10%. Agitador Vortex, incubadora a 37 °, cuarto oscuro. Frasco con torundas en alcohol al 70%, toallas absorbentes, recipiente con hipoclorito de sodio al 2% para las placas de vidrio.

MÉTODO: Se formarán grupos de seis personas. El instructor describirá el equipo, material y soluciones de trabajo. Explicará el procedimiento de la práctica, lectura e interpretación de la prueba. El alumno revisará el huevo embrionado, realizará las diluciones del virus e inoculará el embrión con 0.2 ml. El embrión sometido bajo incubación a 37°C y 72 horas post inoculación Abrirá el embrión y realizara la prueba de hemoaglutinación a partir del líquido alantoideo. Registrara los cambios obtenidos y su interpretación.

RESULTADOS: Muerte del embrión. Presencia de hemoaglutinación.



EVALUACIÓN: Al demostrar el uso del equipo personal de bioseguridad. Comportamiento en la práctica. Participación y respuesta a preguntas realizadas durante la práctica. Lectura e interpretación de la prueba y entrega de su reporte de la práctica.

CUESTIONARIO

¿Qué es el aislamiento viral?

¿Cómo se puede determinar la replicación de un virus en el embrión de pollo?

¿Por qué el virus de Newcastle provoca la muerte del embrión de pollo?

Determinar el título del virus $DIE_{50\%}$ por el método de Reed y Muench o Spearman-Kärber.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Hemoaglutinante: Que es capaz de aglutinar glóbulos rojos.

PRÁCTICA No. 5: CULTIVO DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR (BIA)

INTRODUCCION: El virus de la bronquitis infecciosa aviar es uno de los principales patógenos que afectan a la industria de la avicultura, la BI es una enfermedad respiratoria extremadamente contagiosa, caracterizada por tos, estornudos y estertores, se caracteriza por la disminución en la producción de huevo. Por lo anterior es importante que el estudiante conozca los mecanismos de infección de este virus y las principales lesiones que este produce.

OBJETIVO: Identificar el efecto del virus como resultado de la patogénesis en el hospedador utilizado.

TIEMPO DE REALIZACIÓN: Contemplada en dos sesiones de dos horas, cada una de dos horas.

MATERIAL: Suspensión de virus de la bronquitis infecciosa aviar. Embrión de pollo libre de patógenos específicos. Diluyente PBS. Cuarto oscuro, ovoscopio, lámpara de luz. perforador de huevo, torundas de algodón con alcohol, tubos con tapón de



rosca estériles, pipetas de 1ml estériles, bombilla de bioseguridad, incubadora a 37 °C, jeringas de 1ml con aguja, lápiz marcador, sellador (resistol blanco), bolsas de plástico, pinzas de disección, tijeras rectas, recipiente con desinfectante hipoclorito de sodio al 2%, gradilla para tubos.

METODOLOGÍA: El alumno observará el embrión al cuarto oscuro, inoculará el embrión con 0,2 ml de las diluciones del virus y lo incubara a 37 °C durante una semana. Al final del tiempo se abrirá el embrión, observará los cambios producidos por este virus.

RESULTADOS: Registrara e interpretar los daños patológicos producidos por el virus.

EVALUACION: Uso adecuado del equipo de bioseguridad, habilidad y destreza del alumno en la realización y participación en la práctica, comportamiento y entregará el reporte de lo realizado durante la práctica.

CUESTIONARIO

Describe el término patogénesis

Mencione otros virus de la familia Coronaviridae.

Calcular la DIE50% por el método de Reed y Muench o Spearman-Karber

PRACTICA No. 6: CULTIVO DEL VIRUS DE LA LARINGOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA AVIAR Y/O VIRUS DE LA VIRUELA AVIAR.

INTRODUCCIÓN: La Laringotraqueítis Infecciosa es una enfermedad común a los pollos y faisanes. Ocasionada por un *Herpesvirus*, después de la infección inicial, el virus se replica en el epitelio del tracto respiratorio superior. Viaja a lo largo de los nervios sensitivos y se transforma en infección latente en el ganglio trigémino. La infección afecta principalmente a la



laringe y tráquea, produciendo tos, jadeos y disnea. Las aves infectadas pueden expectorar moco sanguinolento. Las lesiones traqueales son similares a las que se observan en las formas diftéricas de la viruela aviar.

A diferencia del virus de la laringotraqueítis infecciosa, el virus de la viruela o *Poxvirus*, afecta al epitelio de la cabeza y mucosa oral, ambos virus son los principales patógenos que afectan a la avicultura, por eso es importante que el estudiante conozca los mecanismos de infección de estos virus y las principales lesiones que producen.

OBJETIVO: Observar el efecto de estos virus en el hospedador susceptible.

TIEMPO DE REALIZACIÓN: Dos sesiones de dos horas cada una.

MATERIAL Y METODO: Suspensión de virus de la laringotraqueítis, embrión de pollo libre de patógenos específicos, diluyente PBS, tubos estériles con tapón de rosca, bombilla de seguridad, pipetas de 1ml estériles, perforador de huevo, lápiz marcador, ovoscopio, lámpara de luz, sellador (resistol blanco), gradilla para tubos, recipiente con desinfectante hipoclorito de sodio al 2%, bolsas de plástico, tijeras rectas, pinzas de disección, incubadora a 37 °C, torundas de algodón con alcohol al 70%, jeringas de 1ml con aguja, mecheros.

Técnica: Ovoscopiar el embrión en cuarto oscuro y realizar la cámara falsa. Realizar las diluciones del virus e inocular el embrión 0,2 ml vía cámara falsa. Incubar el embrión a 37 °C durante siete días. Abrir el embrión, observar y anotar las lesiones o daños producidos por el virus.

RESULTADOS: Interpretar los resultados del daño observado.

EVALUACION: En este punto se tomará en cuenta el uso apropiado del equipo de seguridad, habilidad y destreza del alumno para la realización de la práctica, participación y comportamiento mostrado durante la misma, el reporte de esta con los resultados obtenidos y bibliografía consultada.

CUESTIONARIO



Mencione que otras especies de la familia Herpesviridae que afectan al embrión de pollo.

Mencione cuales son las principales lesiones producidas por el virus de la viruela aviar.

Defina el término hospedador.

Determinar la DIE50% por el método de Reed y Muench o Spearman-Karber.

PRÁCTICA No. 7: TITULACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN VIRAL

INTRODUCCIÓN: La titulación de los virus es un método importante para realizar diferentes estudios de virus a nivel del laboratorio, el conocimiento de esta técnica permitirá al alumno empezar a introducirse en el diagnóstico y producción de vacunas a virus vivo.

OBJETIVO: Determinar la dosis letal y la dosis infectante 50%.

TIEMPO DE REALIZACIÓN: Contempladas dos horas.

MATERIAL Y METODO: Suspensión de virus,, sistema hospedador cultivos celulares en microplaca con una edad de 24 horas, medio de cultivo celular MEM, diluyente estéril PBS, tubos estériles con tapón de rosca, torundas de algodón con alcohol al 70%, incubadora a 37 °C, bombilla de bioseguridad, mecheros, gradilla para tubos, recipiente con desinfectante hipoclorito de sodio al 2%, micropipetas de 10, 50 200 y 1000 μ l y multipipeta de 200 μ l.

Técnica: Se identificará la microplaca de acuerdo a las diluciones a utilizar. Realizar las diluciones del virus. Inocular los cultivos celulares por dilución con 200 μ l. Incubar a 37°C. durante 7 días bajo atmosfera de CO₂ al 5%. Observar diariamente.

RESULTADOS: Calcular los resultados por el método de Reed y Muench y Spearman-Karber, realizar su interpretación de dosis letal y dosis infectante 50% respectivamente.

Consultar otras observaciones en la literatura, analizarlos y discutirlos con el instructor.



EVALUACION: Será considerando que el alumno porte de forma adecuada el equipo de bioseguridad personal, habilidad y destreza del alumno en la práctica, participación, comportamiento, resultados obtenidos y reporte de lo realizado durante la práctica con bibliografía consultada.

CUESTIONARIO

Describe los principales cultivos celulares utilizados para tal fin.

¿Qué significa dosis letal y dosis infectante 50%?

Interprete el resultado obtenido.

PRÁCTICA No. 8: PRUEBA DE SUERONEUTRALIZACIÓN (SN)

INTRODUCCIÓN: Las técnicas de diagnóstico son una herramienta importante para que el estudiante comprenda las técnicas de laboratorio para identificar de forma indirecta la presencia de un virus como causa de enfermedad.

OBJETIVO: Determinar el título de anticuerpos neutralizantes en el suero sanguíneo y su interpretación.

TIEMPO DE REALIZACIÓN: Dos sesiones de dos horas cada una.

MATERIAL Y METODO: Suspensión de virus vivo con una dosis infectante 50% conocida. Cultivos celulares en microplaca con edad de 24 horas. Medio de cultivo MEM. Diluyente estéril PBS. Tubos estériles con tapón de rosca. Torundas de algodón con alcohol al 70%. Incubadora a 37 °C on atmosfera de CO₂ al 5%. Micropipeta y multipipeta de 200 µl. Campana de flujo laminar. Gradilla para tubos. Recipiente con desinfectante hipoclorito de sodio al 2%.

Técnica: Se identificará la microplaca de acuerdo a las diluciones a utilizar. Realizar las diluciones del virus. Inocular los cultivos celulares con 200 µl e incubar a 37 °C. bajo atmosfera de CO₂ durante 7 días. Observar diariamente. Anotar los cultivos dañados por el virus en comparación con el grupo control.



RESULTADOS: Calcular los resultados obtenidos por el método de Reed y Muench y Spearman-Karber. Interpretar el índice neutralizante del suero 50%.

EVALUACION: Será en base al uso adecuado del equipo de bioseguridad, participación comportamiento, resultados obtenidos y entrega del reporte de la práctica y bibliografía consultada.

CUESTIONARIO:

¿En que consiste la técnica de sueroneutralización?

¿Qué son los anticuerpos neutralizantes?

Mencione otras técnicas diagnósticas para la identificación de anticuerpos.

PRÁCTICA No 9: DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN RÁBICA POR INMUNOFLUORESCENCIA IF

INTRODUCCIÓN: Como muchos otros virus, al igual que este virus rábico se identifican por serotipificación, inmunofluorescencia, histopatología, y por pruebas moleculares para conocer el genotipo (secuencia de nucleótidos), a mayoría de los casos de rabia son causados por cepas del genotipo 1 y serotipo 1. El procedimiento de inmunofluorescencia es ampliamente utilizado, siendo el método preferido para el diagnóstico de la rabia. Es empleado en animales que han muerto y recomendado para el examen inmediato de animales silvestres que no pueden ser mantenidos adecuadamente en observación. Esta prueba es altamente segura y proporciona un diagnóstico rápido. Los hospedadores naturales son todos los animales de sangre caliente y se contrae la infección casi siempre por la mordedura de un animal rabioso. Esta enfermedad representa una de las zoonosis más importantes.

OBJETIVO: Conocer el método rápido y directo de la prueba de inmunofluorescencia.

TIEMPO DE REALIZACIÓN: Se tienen contempladas dos horas prácticas.



MATERIAL Y METODO: Por el riesgo que representa manipular el virus y como medida de bioseguridad esta práctica se describirá en el laboratorio utilizando material didáctico como acetatos transparencias. Es opcional la visita a un laboratorio de referencia en diagnóstico de rabia si se accede al permiso.

Cerebro de animal sospechoso a rabia. Conjugado de rabia. Tejido cerebral positivo y negativo a rabia. Acetona. Diluyente buffer PBS. Vasos de Coplin. Incubadora a 37 °C. Refrigerador y Congelador tipo doméstico. Microscopio de Epifluorescencia.

Técnica: Preparación de improntas de las muestras problema, improntas positivas y negativas en portaobjetos. Teñir las improntas con conjugado antirrábico. Incubar las laminillas por 45 minutos a 37°C. Lavar las muestras en PBS, montar glicerina buffer y cubreobjeto. Observar al microscopio de fluorescencia e interpretar los resultados obtenidos.

RESULTADOS: El alumno comparará las diferentes técnicas de laboratorio que se utilizan para el diagnóstico de la rabia, realizando un reporte del fundamento de las diferentes técnicas y conclusiones de la práctica.

EVALUACIÓN: Participación activa durante la exposición de la práctica, comportamiento, reporte de resultados, los cuales se analizarán y discutirán con el instructor, apoyados en respaldo bibliográfico.

CUESTIONARIO

Mencione tres métodos para el diagnóstico de rabia.

Mencione el fundamento de la técnica de Inmunofluorescencia.

Mencione las medidas de conservación y envío al laboratorio de una muestra sospechosa de rabia.

Mencione las principales características del virus de la rabia.

Describa la patogénesis del virus rábico.

Mencione los órganos de elección para el diagnóstico de rabia.



PRÁCTICA No. 10: VISITA DE ESTUDIO A UNA INSTITUCIÓN DE INTERÉS FORMATIVO

INTRODUCCIÓN: Despertar en el estudiante la inquietud por conocer como esta estructurado un laboratorio dedicado a la producción de biológicos para uso en animales.

OBJETIVO: Complementar y valorar su formación y su preparación profesional a favor de la salud animal.

LUGAR DE REALIZACIÓN: La práctica se llevará a cabo previa solicitud del instructor a un laboratorio de referencia: INIFAP, Industria Privada, CENASA, Laboratorio Estatal.

TIEMPO DE REALIZACIÓN: Depende de la distancia y ubicación de la institución.

MATERIAL Y METODO: Autobús de la Institución. Instructor responsable de la práctica, Permiso de la institución a visitar.

RESULTADOS: Reporte de la visita al laboratorio.

EVALUACIÓN: Se considerará el comportamiento mostrado durante las diversas actividades, el uso adecuado del equipo de bioseguridad personal con participación activa y responsable durante la realización de la práctica.

Reporte de la práctica.

CUESTIONARIO: Mencione las características de la institución visitada considerando una cuartilla para su reporte.