

LABORATORIO DE SANIDAD Y GENETICA ANIMAL

SUPUESTO N°1:

Ante una sospecha de enfermedad con aparición de lesiones vesiculares en una explotación de ganado porcino, se consulta al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) con el fin de llevar a cabo la toma de muestras y el diagnóstico de la enfermedad.

PREGUNTA n° 1:

¿Qué patógenos víricos habría que considerar como posibles agentes causales de esta sintomatología? Describir brevemente cada uno.

PREGUNTA n° 2:

¿Qué tipo de muestras serían las idóneas para confirmar la enfermedad en los animales afectados? Describir brevemente como se debería realizar la toma de muestras y el envío al laboratorio.

PREGUNTA n° 3:

Ante la posibilidad de que el agente infeccioso sea el virus de la fiebre aftosa, exponga de modo resumido un ejemplo de la evaluación del riesgo en el manejo de muestras sospechosas y de la gestión del riesgo (controles de funcionamiento, controles de ingeniería y equipos de protección personal) que el laboratorio debe tener establecido para este agente, conforme a las directrices de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

PREGUNTA n° 4:

Una vez consultado al LNR se remiten 40 muestras correspondientes a suero sanguíneo y epitelio obtenido de las vesículas de 20 animales diferentes conforme a la tabla recogida en el Anexo I.

Describa las técnicas diagnósticas que emplearía en cada tipo de muestra para determinar el agente patógeno implicado, incluyendo tanto la detección e identificación del virus como la posible respuesta inmune frente al mismo conforme a las directrices de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

PREGUNTA nº 5:

Se realiza un ensayo de enzimoimmunoanálisis de bloqueo, en placas e ELISA tapizadas con la proteína no estructural 3ABC del virus de fiebre aftosa en dos grupos de muestras. Las muestras 1 a 13 se analizan en la placa nº 1 y las muestras 14 a 20 se analizan en la placa nº 2, todas por duplicado del suero conforme al esquema descrito en el Anexo II.

Los resultados que se obtuvieron se recogen en el Anexo III:

Basándose en los datos obtenidos. ¿qué conclusiones puede extraer a partir de estos datos?

PREGUNTA nº 6:

De modo paralelo, se realiza la amplificación de una región del genoma del virus de fiebre aftosa específica del serotipo viral por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a partir de muestras de tejido epitelial.

- 1) Explique brevemente, el fundamento de la PCR necesaria para poder detectar este agente biológico.
- 2) Los resultados que se obtuvieron están recogidos en el Anexo IV. Basándose en los datos obtenidos. ¿qué conclusiones puede extraer a partir de estos datos?

PREGUNTA nº 7:

A partir de la información que dispone para cada muestra,

- ¿Qué conclusiones puede extraer sobre el diagnóstico para virus de fiebre aftosa del serotipo O y A?
- ¿Esos resultados serían fiables y finales? o ¿Debe establecer alguna medida/mejora para poder emitir un diagnóstico final?

Anexo I – Supuesto práctico nº 1

Identificación de las muestras recibidas.

Muestra	Identificación animal	Tipo	N2 Explotación	Región de origen
S-101	1	Suero sanguíneo	ES1000	Pirineos
S-102	2	Suero sanguíneo	ES2000	Pirineos
S-103	3	Suero sanguíneo	ES2000	Pirineos
S-104	4	Suero sanguíneo	ES2000	Pirineos
S-105	5	Suero sanguíneo	ES3000	Islas
S-106	6	Suero sanguíneo	ES3000	Islas
S-107	7	Suero sanguíneo	ES3000	Islas
S-108	8	Suero sanguíneo	ES4000	Islas
S-109	9	Suero sanguíneo	ES4000	Islas
S-110	10	Suero sanguíneo	ES4000	Islas
S-111	11	Suero sanguíneo	ES5000	Islas
S-112	12	Suero sanguíneo	ES5000	Islas
S-113	13	Suero sanguíneo	ES5000	Islas
S-114	14	Suero sanguíneo	E55000	Islas
S-115	15	Suero sanguíneo	ES5000	Islas
S-116	16	Suero sanguíneo	ES6000	Pirineos
S-117	17	Suero sanguíneo	ES6000	Pirineos
S-118	18	Suero sanguíneo	E56000	Pirineos
S-119	19	Suero sanguíneo	ES6000	Pirineos
S-120	20	Suero sanguíneo	ES6000	Pirineos

Muestra	Identificación animal	Tipo	Nº Explotación	Región de origen
E-101	1	Epitelio de vesícula	ES1000	Pirineos
E-102	2	Epitelio de vesícula	E52000	Pirineos
E-103	3	Epitelio de vesícula	ES2000	Pirineos
E-104	4	Epitelio de vesícula	ES2000	Pirineos
E-105	5	Epitelio de vesícula	ES3000	Islas
E-106	6	Epitelio de vesícula	ES3000	Islas
E-107	7	Epitelio de vesícula	E53000	Islas
E-108	8	Epitelio de vesícula	ES4000	Islas
E-109	9	Epitelio de vesícula	ES4000	Islas
E-110	10	Epitelio de vesícula	ES4000	Islas
E-111	11	Epitelio de vesícula	ES5000	Islas
E-112	12	Epitelio de vesícula	ES5000	Islas
E-113	13	Epitelio de vesícula	ES5000	Islas
E-114	14	Epitelio de vesícula	ES5000	Islas
E-115	15	Epitelio de vesícula	ES5000	Islas
E-116	16	Epitelio de vesícula	ES6000	Pirineos
E-117	17	Epitelio de vesícula	ES6000	Pirineos
E-118	18	Epitelio de vesícula	ES6000	Pirineos
E-119	19	Epitelio de vesícula	ES6000	Pirineos
E-120	20	Epitelio de vesícula	ES6000	Pirineos

Anexo II - Supuesto práctico nº 1

Distribución de las muestras de suero sanguíneo en placa de 96 pocillos para el ensayo de ELISA de bloqueo

Placa nº1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Neg	S- 102	S- 106	S- 110								
B	Neg	S- 102	S- 106	S- 110								
C	Pos- d	S- 103	S- 107	S- 111								
D	Pos- d	S- 103	S- 107	S- 111								
E	Pos	S- 104	S- 108	S- 112								
F	Pos	S- 104	S- 108	S- 112								
G	S- 101	S- 105	S- 109	S- 113								
H	S- 101	S- 105	S- 109	S- 113								

Placa nº2:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Neg	S- 115	S- 119									
B	Neg	S- 115	S- 119									
C	Pos- d	S- 116	S- 120									
D	Pos- d	S- 116	S- 120									
E	Pos	S- 117										
F	Pos	S- 117										
G	S- 114	S- 118										
H	S- 114	S- 118										

Claves:

- Neg: Control negativo
- Pos-d: Control positivo diluido
- Pos: Control positivo
- S-: Muestra de suero

Anexo III - Supuesto práctico nº 1

Resultados obtenidos en la detección de NSP en suero.

Medición de resultados del ELISA.

- Para la lectura del ensayo y cálculo de los resultados se ha medido la densidad óptica (DO) de los pocillos a 450nm.
- Se calcula la DO₄₅₀ media de los pocillos A1 y B1 (negativos) siendo este valor la DO₄₅₀ máxima.
- Los valores DO₄₅₀ de las muestras y de los controles positivos se expresan como la inhibición porcentual (IP) relativa a la DO₄₅₀ máxima según la fórmula:

$$IP = 100 - \left[\frac{DO_{450} \text{ de la muestra}}{DO_{450} \text{ máx.}} \right] \times 100$$

Criterios de validación de los resultados:

- La DO₄₅₀ media máx. (DO₄₅₀ del control negativo) debe ser > 1,000.
- La inhibición porcentual media del control positivo diluido debe ser >50%.
- La inhibición porcentual media del control positivo debe ser >70%.
- El no cumplimiento de estos criterios es motivo suficiente para descartar los resultados de la placa.

Interpretación de la inhibición porcentual:

- IP = < 50% (negativo) No hay anticuerpos contra la proteína NS del FMDV en la muestras del ensayo.
- IP = >50% (positivo) Hay anticuerpos contra la proteína NS del FMDV en la muestra del ensayo.

Resultados de las lecturas de D0450 y cálculos de inhibición porcentual (IP):

Placa nº 1			
Pocillo	muestra	D.0.450	IP
Al	Neg	1,900*	n.a
B1	Neg		n.a
Cl	Pos -d	0,600	61,84**
D1	Pos -d	0,850	
E1	Pos	0,360	80,79**
Fi	Pos	0,370	
G1	S - 101	0,100	94,74
H1	S - 101	0,105	94,47
A	S -102	0,190	90,00
B2	S -102	0,180	90,53
C2	S -103	0,220	88,42
D2	S -103	0,240	87,37
E2	S -104	0,210	88,95
F2	S -104	0,220	88,42
G2	S -105	0,540	71,58
H2	S -105	0,530	72,11
A3	S -106	0,480	74,74
B3	S -106	0,485	74,47
C3	S -107	1,700	10,53
D3	S -107	1,750	7,89
E3	S -108	1,760	7,37
F3	S -108	1,770	6,84
G3	S -109	0,240	87,37
H3	S -109	1,580	16,84
A4	S -110	0,500	73,68
B4	S -110	0,540	71,58
C4	S -111	1,560	17,89
D4	S -111	1,650	13,16
E4	S -112	1,750	7,89
F4	S -112	1,740	8,42
G4	S -113	0,930	51,05
H4	S -113	0,935	50,79

Placa nº 2			
Pocillo	muestra	D.0.450	IP
Al	Neg	1,900*	n.a
B1	Neg		n.a
Cl	Pos -d	1,000	42,11**
D1	Pos -d	1,200	
E1	Pos	0,650	60,53**
Fi	Pos	0,850	
G1	S - 114	1,740	8,42
H1	s -114	1,730	8,95
A	s -115	1,790	5,79
B2	S -115	1,800	5,26
C2	S -116	0,220	88,42
D2	S -116	0,240	87,37
E2	S -117	1,780	6,32
F2	s -117	1,750	7,89
G2	S-118	0,540	71,58
H2	S -118	0,530	72,11
A3	S -119	1,650	13,16
B3	S -119	1,630	14,21
C3	s -no	1,740	8,42
D3	S -120	1,700	10,53

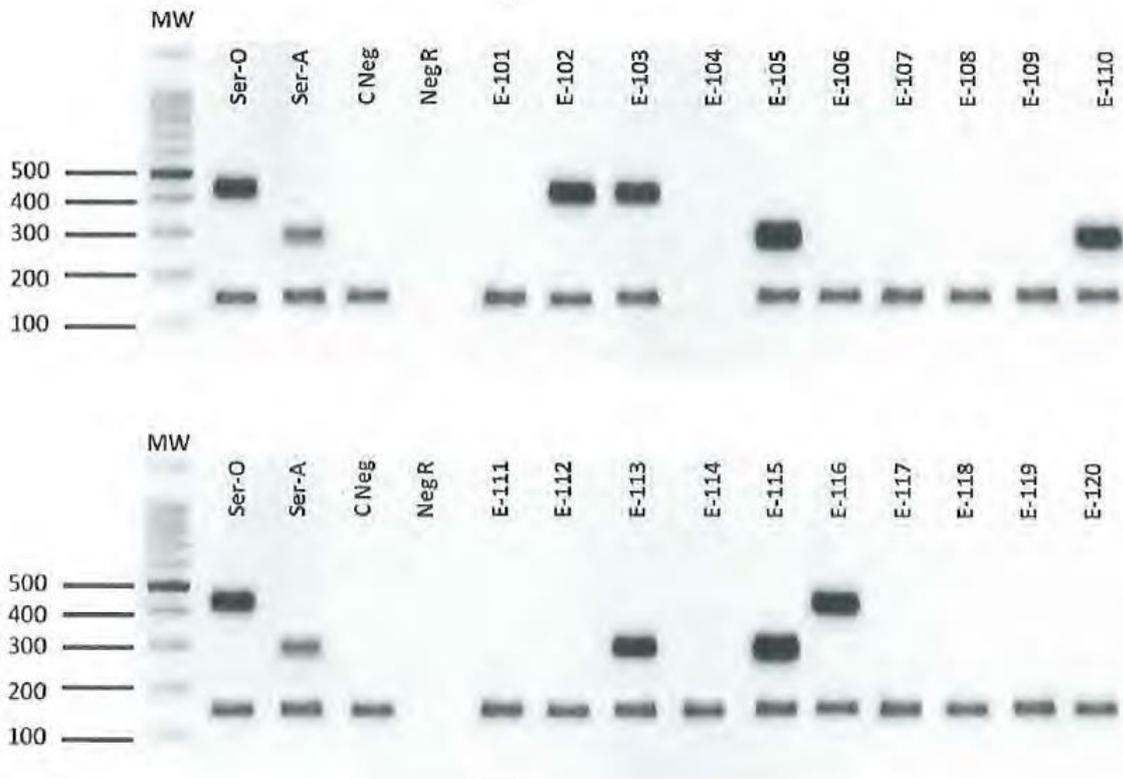
n.a. : No aplica

* Densidad óptica media calculada

** Inhibición porcentual media calculada

Anexo IV - Supuesto práctico nº 1

Resultados obtenidos en la detección de virus del serotipo O y A por PCR convencional y electroforesis en gel de agarosa.



La PCR utilizada ha sido una PCR duplex para los serotipos O y A del virus de fiebre aftosa que lleva incluido un control positivo de PCR para un gen de porcino en la misma reacción.

El tamaño esperado para el fragmento específico de serotipo O es de 450 pares de bases nucleotídicas, el del serotipo A de 300 pares de bases nucleotídicas y el del control positivo de porcino de 160 pares de bases nucleotídicas.

Claves:

- MW: Marcador de peso molecular en pares de bases.
- Ser-O: Control positivo de material genético extraído a partir de epitelio de porcino infectado por virus del serotipo O.
- Ser-A: Control positivo de material genético extraído a partir de epitelio de porcino infectado por virus del serotipo A.
- CNeg: Control negativo de extracción de epitelio de porcino libre de enfermedad.
- NegR: Control de reacción negativo. La muestra es agua libre de ADN.
- E-: Muestra de ADN procedente de epitelio.

LABORATORIO DE SANIDAD Y GENETICA ANIMAL

SUPUESTO N° 2:

Dentro del procedimiento de una Inspección Oficial realizada por la Autoridad competente sobre una serie de silos destinados al almacén de soja para alimentación animal, se desea determinar la presencia de organismos modificados genéticamente relacionados con esta especie o posibles contaminantes en ellos.

PREGUNTA N° 1:

¿Qué tipo de actuaciones se deben realizar para enviar muestras al laboratorio para su análisis? Describir tanto la toma de muestras como el envío al laboratorio.

PREGUNTA N° 2:

Una vez tomadas las muestras se remiten 30 muestras al laboratorio correspondientes a muestras de harina de semilla conforme a la tabla recogida en el Anexo I.

¿Qué requisitos debe cumplir tanto el laboratorio como los métodos para el cribado en primera instancia con el fin de determinar si las muestras poseen eventos de organismos modificados genéticamente?

PREGUNTA N° 3:

Con el fin de descartar la presencia soja Roundup Ready (o soja 40-3-2) positiva a la proteína CP4 EPSPS que confiere resistencia al glifosato, se realiza un ensayo de enzimoimmunoanálisis de tipo Sandwich en placas de ELISA, dos grupos de muestras, frente a esta proteína. Las muestras 1 a 20 se analizan en la placa n°1 y las muestras 21 a 30 se analizan en la placa n°2, todas las muestras por duplicado, conforme a lo descrito en el Anexo II.

Los resultados que se obtuvieron se recogen en el Anexo III:

Basándose en los datos obtenidos. ¿Qué conclusiones puede extraer a partir de estos datos?

PREGUNTA Nº 4:

De modo paralelo, se realiza la amplificación de una región específica frente al promotor 35-S por la técnica de reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real con sondas de hidrólisis, conforme a las directrices de los métodos del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Organismos Modificados Genéticamente.

- 1) Explique el fundamento de la PCR descrita para este evento.
- 2) Los resultados que se obtuvieron están recogidos en el Anexo IV. Basándose en los datos obtenidos. ¿qué conclusiones puede extraer a partir de estos datos?

PREGUNTA Nº 5:

A partir de la información de que dispone para cada muestra,

- ¿Qué conclusiones puede extraer sobre la detección de OMG en cada silo analizado?
- ¿Esos resultados, considerados cualitativamente, serían fiables y definitivos o se debe establecer alguna medida/mejora para poder emitir un dictamen final?

PREGUNTA Nº 6:

¿Qué métodos puede realizar para conocer la presencia de otras especies/eventos contaminantes en la muestra?

PREGUNTA Nº 7:

A la vista de los resultados obtenidos, se requiere al laboratorio la cuantificación de presencia de evento para conocer el % de OMG presente en las muestras.

- 1) ¿Qué tipo de ensayo debe realizar para poder conocer esta información?
- 2) ¿Qué factores deben tenerse en cuenta para la estimación de la incertidumbre a la hora de incluirla en los resultados finales?

Anexo I – Supuesto práctico nº 2

Identificación de las muestras recibidas.

Muestra	Tipo	Nº Silo
H-101	Harina de semilla	S1000
H-102	Harina de semilla	S2000
H-103	Harina de semilla	S2000
H-104	Harina de semilla	52000
H-105	Harina de semilla	S3000
H-106	Harina de semilla	S3000
H-107	Harina de semilla	S3000
H-108	Harina de semilla	54000
H-109	Harina de semilla	54000
H-110	Harina de semilla	S4000
H-111	Harina de semilla	S5000
H-112	Harina de semilla	55000
H-113	Harina de semilla	55000
H-114	Harina de semilla	S5000
H-115	Harina de semilla	55000
H-116	Harina de semilla	S6000
H-117	Harina de semilla	S6000
H-118	Harina de semilla	56000
H-119	Harina de semilla	56000
H-120	Harina de semilla	S6000
H-121	Harina de semilla	S7000
H-122	Harina de semilla	S7000
H-123	Harina de semilla	S7000
H-124	Harina de semilla	S7000
H-125	Harina de semilla	S7000
H-126	Harina de semilla	S8000
H-127	Harina de semilla	S8000
H-128	Harina de semilla	S8000
H-129	Harina de semilla	S8000
H-130	Harina de semilla	58000

Anexo II – Supuesto práctico nº 2

Distribución de las muestras de harina en placa de 96 pocillos para el ensayo de ELISA de tipo sandwich

Placa nº1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Neg	H-103	H-107	H-111	H-115	H-119						
B	Neg	H-103	H-107	H-111	H-115	H-119						
C	Pos	H-104	H-108	H-112	H-116	H-120						
D	Pos	H-104	H-108	H-112	H-116	H-120						
E	H-101	H-105	H-109	H-113	H-117							
F	H-101	H-105	H-109	H-113	H-117							
G	H-102	H-106	H-110	H-114	H-118							
H	H-102	H-106	H-110	H-114	H-118							

Placa nº2:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Neg	H-123	H-127									
B	Neg	H-123	H-127									
C	Pos	H-124	H-128									
D	Pos	H-124	H-128									
E	H-121	H-125	H-129									
F	H-121	H-125	H-129									
G	H-122	H-126	H-130									
H	H-122	H-126	H-130									

Claves:

- Neg: Control negativo
- Pos: Control positivo
- H-: Muestra de harina

Anexo III - Supuesto práctico nº 2

Resultados obtenidos en la detección de proteína CCP4 EPSP en Harina.

Medición de resultados del ELISA.

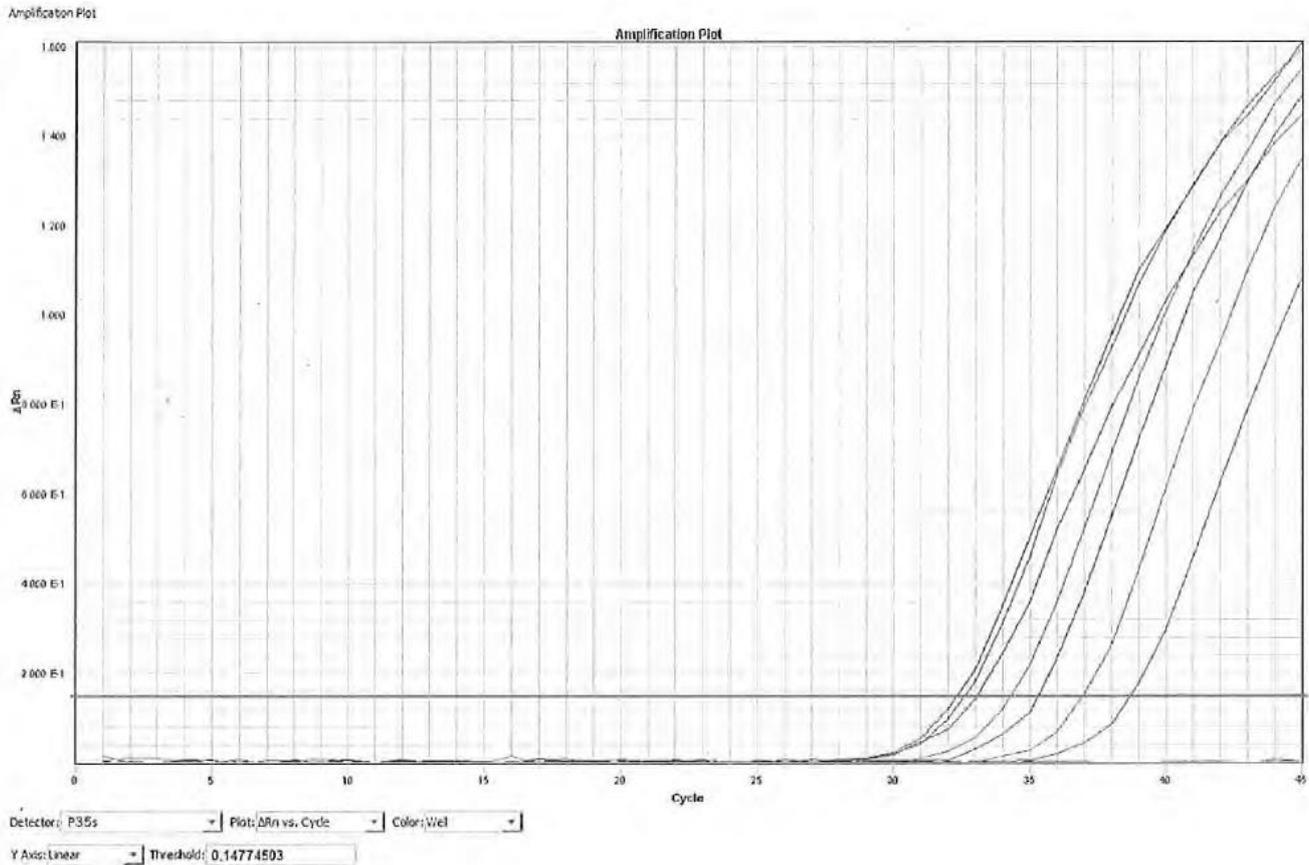
- Para la lectura del ensayo y cálculo de los resultados se ha medido la densidad óptica (DO_{450}) de los pocillos a 450nm.
- Las DO_{450} media de muestras cuyo valor esté por debajo de 0,200, se considerarán negativas.
- Las DO_{450} media de muestras cuyo valor esté por encima de 0,200, se considerarán positivas.

Criterios de validación de los resultados:

- La DO_{450} de los controles negativos debe ser menor a 0,200.
- La DO_{450} de los controles positivos debe ser superior a 0,200.
- El no cumplimiento de estos criterios es motivo suficiente para descartar los resultados de la placa.

Anexo IV - Supuesto práctico nº 2

Resultados obtenidos en la detección de Promotor 35-S con PCR en tiempo real.



La PCR utilizada ha sido una PCR en tiempo real para la detección de promotor 35S. Los valores medios de Ct para cada muestra fueron los siguientes:

Muestra	Gen diana	Ct medio
Control 1%	P-35S	34,3
Control 0,1% (límite de cuantificación)	P-35S	37,0
Muestra Silo 1000	P-35S	n.d.
Muestra Silo 2000	P-35S	38,7
Muestra Silo 3000	P-35S	33,1
Muestra Silo 4000	P-35S	n.d.
Muestra Silo 5000	P-35S	32,3
Muestra Silo 6000	P-35S	n.d.
Muestra Silo 7000	P-35S	36,3
Muestra Silo 8000	P-35S	32,6

Los datos presentados son el valor promedio para las muestras obtenidas en cada silo y los resultados en las diferentes muestras del mismo silo se asumen homogéneos sin que presentaran una variedad significativa.

LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS

SUPUESTO Nº1:

1. Se desea cuantificar los ácidos orgánicos presentes en un zumo de naranja. Explique la metodología a emplear, indicando las técnicas analíticas utilizadas, su fundamento y características analíticas.
2. Si se observan desviaciones sobre los contenidos de azúcares especificados en la reglamentación, R.D. 1518/2007, explique los posibles fraudes que han podido causar estas anomalías.
3. Se sospecha de un posible fraude por adición de agua al zumo y su posterior adición simultánea de azúcares y ácidos orgánicos exógenos. Describa las técnicas que pueden emplearse para la detección de estas prácticas, así como los parámetros analíticos a estudiar.

LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS

SUPUESTO Nº 2

1. Un laboratorio de control oficial que tiene implantado un Sistema de Gestión conforme a la Norma Internacional UNE-EN ISO/IEC 17025 desearía incluir en su alcance de acreditación la determinación de Pb^{2+} en H_2O , mediante una técnica analítica de espectroscopía atómica.
2. Se pide que se describan los fundamentos de las técnicas que se podrían emplear, así como que se definan sus características analíticas y los criterios que se emplearían a la hora de seleccionar la técnica más adecuada para dicho análisis de acuerdo a los contenidos habitualmente presentes.
3. Indique la sistemática a establecer para definir las operaciones de aseguramiento de la calidad interna y externas que debería implementar.
4. El laboratorio ha realizado la validación para la determinación de Pb^{2+} en H_2O obteniendo los siguientes valores:
 - Sr
 - SR
 - Recuperación (valor real)
 - U (k=2)

Se pide que se definan los criterios de aceptación para el aseguramiento de la calidad para cada uno de los elementos. Indique los requisitos que deberían cumplir si se desea utilizar una curva de calibrado.

5. Para poder realizar el seguimiento de la validez de los ensayos y las calibraciones llevadas a cabo, el laboratorio desea participar en ejercicios de intercomparación. Indique los criterios que deben evaluarse para seleccionar el programa adecuado, de acuerdo a la NT-03.