



MINISTERIO
DE AGRICULTURA Y PESCA,
ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

TRIBUNAL CALIFICADOR ESCALA DE
TITULADOS DE ESCUELAS TÉCNICAS DE
GRADO MEDIO DE OAAA DEL MAPA

(BOE 29 de noviembre de 2017)

TERCER EJERCICIO (TURNO LIBRE)

Especialidad Laboratorios de Sanidad y Genética Animal

Supuesto nº2

En una explotación de animales bovinos, se observa signos neurológicos compatibles con una Encefalopatía Espongiforme Transmisible en 4 animales.

Tras el sacrificio de los animales, se toman muestras, entre otras, de tronco encefálico que son enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia siguiendo las indicaciones del Programa Nacional de Vigilancia de la Encefalopatía Espongiforme Bovina.

PREGUNTA nº1:

Se realiza un ensayo de enzimoimmunoanálisis de captura de doble anticuerpo (método sándwich) para la detección de PrP^{Res}, efectuado tras una fase de desnaturalización y otra de concentración de proteína del prión con las muestras recibidas. Las muestras 1 y 2 se analizan en la placa nº1 y las muestras 3 y 4 se analizan en la placa nº2, todas por duplicado conforme al esquema descrito en el Anexo I. Igualmente, los resultados que se obtuvieron se recogen en el Anexo I.

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

PREGUNTA nº 2:

Durante la realización del ELISA de captura tipo sándwich se debe emplear un reactivo que presenta el siguiente pictograma en su ficha FDS:



Indique las medidas que son necesarias para manipular dicho reactivo.

PREGUNTA nº3:

De modo paralelo, se realiza la detección de PrP^{Res} a partir de tronco encefálico mediante una técnica rápida de inmunotransferencia basada en un procedimiento de Western blot para la detección del fragmento PrP^{Res} resistente a la proteinasa K, utilizando un anticuerpo frente a la parte central de la proteína. El esquema de carga de las muestras y los resultados obtenidos se recogen en el Anexo II.

- 1) Explique brevemente las conclusiones que se pueden extraer a partir de los resultados obtenidos y recogidos en el Anexo II.
- 2) De las dos técnicas empleadas para analizar la presencia de la PrP^{Res}, ¿qué resultados deben aparecer en el informe final para la confirmación de la enfermedad en los animales de la explotación según el Reglamento UE Nº 1148/2014? Justifique su respuesta.

PREGUNTA nº4:

El dueño de la explotación muestra su disconformidad con los resultados emitidos e indica que ha podido haber un error en la trazabilidad de las muestras. Puesto que su explotación está incluida en un programa de mejora de raza, el laboratorio dispone de muestras de sangre de los animales que mostraron signos. Para poder excluir el supuesto error, se solicita un análisis de control de identidad.

- 1) ¿Qué tipo de marcadores moleculares se pueden emplear para el análisis de control de identidad?
- 2) ¿Qué técnicas se utilizan para su detección?

PREGUNTA nº5:

El laboratorio está acreditado mediante la norma ISO 17025 para la realización del ensayo de enzimoimmunoanálisis de captura tipo sándwich. Como parte de la evaluación de la calidad de este ensayo, incluye controles internos positivos y negativos trimestralmente.

En el anexo III se recoge tanto la descripción de los controles internos empleados, así como los resultados obtenidos con dichos controles durante el último año y medio.

- 1) Represente los resultados obtenidos en el gráfico de control correspondiente.
- 2) Explique la representación que ha obtenido en los gráficos de control, y si es necesario tomar alguna medida.

Placa nº2:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control Neg	M-3										
B	Control Neg	M-3										
C	Control Neg	M-4										
D	Control Neg	M-4										
E	Control Pos											
F	Control Pos											
G												
H												

Resultados obtenidos:

Resultados de DO₄₅₀₋₆₂₀ obtenidos en la detección de PrP^{Res} en tronco encefálico.

Cálculo e interpretación de los resultados.

- Para la lectura del ensayo y cálculo de los resultados se ha medido la densidad óptica (DO) de los pocillos a 450nm y 620nm.
- Se calcula la DOR3 correspondiente a la media de los cuatro controles negativos (Pocillos A1, B1, C1 y D1).
- Se calcula la DOR4 correspondiente a la media de los dos controles positivos (Pocillos E1 y F1)
- Se calcula el valor umbral según la fórmula:

$$\text{Valor umbral: } DOR3 + 0,210$$

- Condiciones de validación de la placa:
 - Todos los valores para el control negativo deben ser inferiores a 0,150 unidades de DO. Se puede eliminar como máximo un valor individual si la DO es superior o igual a 0,150.
 - La DOR4 debe ser superior o igual a 1'0.
 - El no cumplimiento de estos criterios es motivo suficiente para descartar los resultados de la placa.

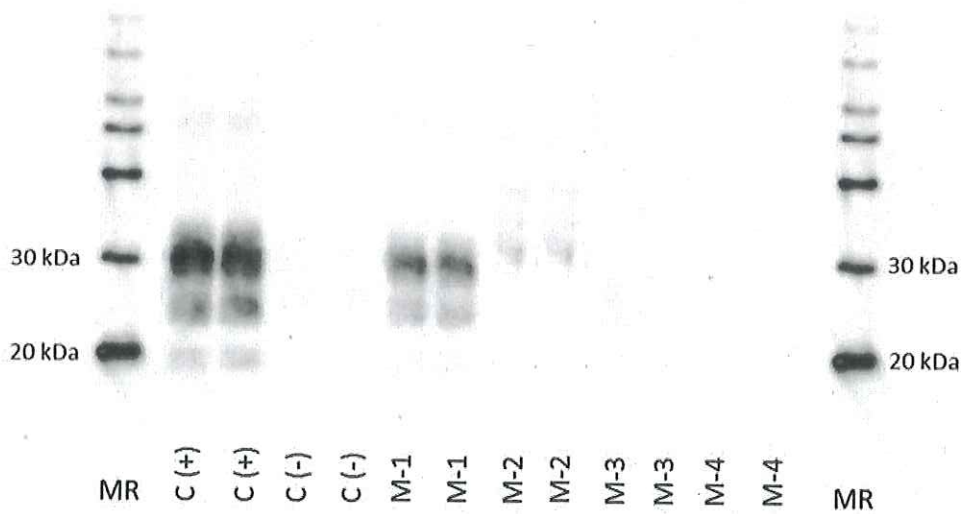
ANEXO II

Esquema de distribución de las muestras:

Distribución de carga de las muestras de tronco encefálico en los geles de acrilamida de 17 pocillos al 12%

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
VACÍO	VACÍO	MARCADOR	Control (+)	Control (+)	Control (-)	Control (-)	M-1	M-1	M-2	M-2	M-3	M-3	M-4	M-4	MARCADOR	VACÍO

Resultados obtenidos:



ANEXO III

Descripción de los controles internos empleados:

- BP01nn: Control positivo fuerte a Encefalopatía Espongiforme Bovina.
Nn indica el número de lote de dicho control.
- BN01nn: Control negativo a Encefalopatía Espongiforme Bovina.
Nn indica el número de lote de dicho control.

	Media-3 δ	Media-2 δ	Media	Media+2 δ	Media+3 δ
BP01	2,610	2,801	3,183	3,565	3,756
BN01	0,009	0,013	0,021	0,030	0,034

Resultados obtenidos:

Fecha	Control empleado	Valor de DO Medio
Julio 2016	BP0101	3,254
	BN0101	0,026
Octubre 2016	BP0101	3,051
	BN0101	0,017
Enero 2017	BP0102	3,332
	BN0102	0,015
Abril 2017	BP0102	2,768
	BN0102	0,022
Julio 2017	BP0103	2,699
	BN0103	0,011
Octubre 2017	BP0103	2,795
	BN0103	0,019
Enero 2018	BP0104	2,683
	BN0104	0,041