

# ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA

Madrid, 27 – 29 de junio de 2011

## MATERIALES DE REFERENCIA PARA PCR

Elena San Miguel Ibáñez. Dpto. de PCR

LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA (ALGETE)

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011  
MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

## MATERIAL DE REFERENCIA

Material o sustancia en la cual una o varias de sus propiedades son suficientemente homogéneas y están bien definidas.

Se utilizan:

- para la calibración de instrumentos,
- para la evaluación de un método de análisis,
- para la asignación de valores a otros materiales.

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

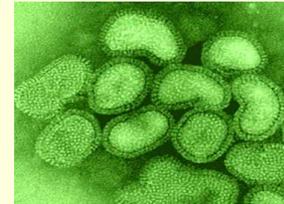
## MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

### TIPOS DE MATERIALES DE REFERENCIA EN EL DEPARTAMENTO DE PCR

#### a) Suspensiones bacterianas o víricas

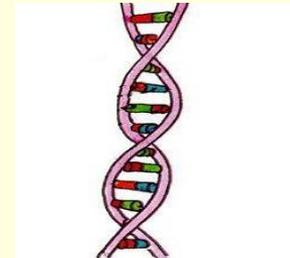
*Campylobacter lari*, *Taylorella equigenitalis*, *T. asinigenitalis*,  
Virus de la Lengua Azul, Virus de la Influenza Aviar,

Virus de la Enfermedad de Newcastle, Virus de la Peste Equina Africana



#### b) Suspensiones de ácidos nucleicos

De bacterias y virus



#### c) Muestras positivas

Muestras positivas de enfermedades cuyo agente etiológico (bacteria, virus) no es o es difícilmente aislable o no es posible hacerlo, de momento, en nuestro laboratorio, o interesa para utilizar en controles de calidad



ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011  
MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

Para utilizar en las **reacciones de PCR** de detección del genoma de cada microorganismo

1. En el propio laboratorio, LCV
2. Para proporcionar a los laboratorios de la **red de Laboratorios de Sanidad Animal**

## ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

### MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

## ORIGEN

De otros Departamentos del LCV:

- . Enfermedades Emergentes (suspensión virus BTV)
- . Enfermedades de las Aves y otras especies (sv AIV)
- . Patología de Mamíferos (sv Enfermedad de Aujeszky)
- . Enfermedades de los Peces (sv Herpesvirus de Koi)
- . Bacteriología (suspensión bacteriana *Campylobacter fetus venerealis*)
- . Salmonelosis (sb *Salmonella*)

\* Cultivados en cada Departamento (procedente del EU-RL, aislados por el propio Dpto, cesiones de otros laboratorios)

Solicitado por/para el Dpto de PCR:

- . Ácidos nucleicos (*Escherichia coli* O104)

De muestras analizadas en el Dpto. PCR: muestras positivas, por su interés para controles de calidad o porque no son cultivables o al menos no lo son, de momento, en el LCV (virus de la Fiebre Catarral Maligna *OvHV-2*)

**ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011**  
**MATERIALES DE REFERENCIA. PCR**

**TRAZABILIDAD:**

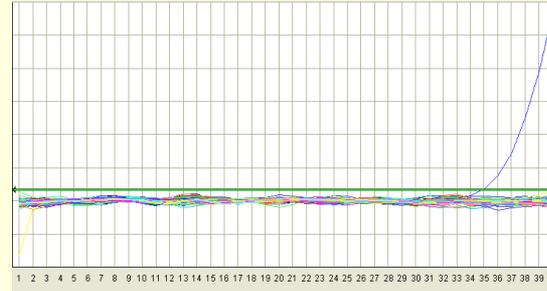
- **El Dpto del LCV que proporciona la muestra, la acompaña de su correspondiente Certificado de Calidad**
- **El EU-RL proporciona una documentación acompañando a la muestra**
- **En el caso de una muestra analizada en el Dpto. de PCR, identificada con el número de registro de entrada y el número de muestra**

## ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

### MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

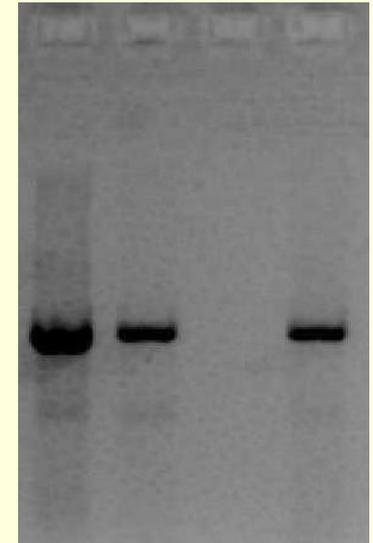
Dar valor de PCR:

- PCR en tiempo real: Ct



- PCR convencional: intensidad de banda (escala numérica, de cruces)

Realizar el análisis de PCR: varias repeticiones



# ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

## MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

 MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO	DEPARTAMENTO DE PCR	
	MATERIAL DE REFERENCIA	
	CÓDIGO:	
		PÁGINA N°

DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL:	LOTE N°:
SUMINISTRADOR:	FECHA DE RECEPCIÓN:
CANTIDAD Y FORMATO:	FECHA FINAL:
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:	
LOCALIZACIÓN:	CADUCIDAD:
VALOR TÉCNICAS NO PCR:	OBSERVACIONES:

MATERIAL USADO PARA DILUIR	FECHA PREPARACIÓN DILUCIÓN	DILUCIÓN	VALOR PCR	EXTRACCIÓN / PCR	OBSERVACIONES (uso, unidades preparadas, volumen,...)

# ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

## MATERIALES DE REFERENCIA PCR

 MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO	<b>DEPARTAMENTO DE PCR</b>	
	<b>MATERIAL DE REFERENCIA</b>	
	<b>CÓDIGO:</b> SV-BTV S1 SPA07	<b>PÁGINA N°</b> 1

<b>DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL:</b> Suspensión de virus de la Lengua Azul Serotipo 1 SPA/07	LOTE N°: 01/10
SUMINISTRADOR: Departamento de Enfermedades Emergentes LCV	FECHA DE RECEPCIÓN: febrero 2010
CANTIDAD Y FORMATO: Vial con 1 ml	FECHA FINAL:
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: Congelado -70 °C	
LOCALIZACIÓN: Congelador EQ/PCR-26	CADUCIDAD: Febrero 2015
VALOR TÉCNICAS NO PCR: 3 . 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	OBSERVACIONES: P68/10. Ver Certificado Dpto Enfermedad Emergentes

MATERIAL USADO PARA DILUIR	FECHA PREPARACIÓN DILUCIÓN	DILUCION	VALOR PCR	EXTRACCION / PCR	OBSERVACIONES (uso, unidades preparadas, volumen,...)
Agua PCR	20-2-2010	-1	22,82 ± 0,45	20-2-2010	Para utilizar con CE+ en el Dpto de PCR
		-2	26,72 ± 0,26		
		-3	28,45 ± 0,55		
		-4	31,05 ± 0,73		
		-5	34,92 ± 0,92		
		-6	Resultado no repetitivo		

# ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

## MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

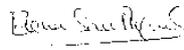
 MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO	<b>DEPARTAMENTO DE PCR</b>	
	<b>MATERIAL DE REFERENCIA</b>	
	CÓDIGO: SV-NDV-ULSTER 2C-I	PÁGINA N° 1

DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL: Suspensión de virus de la Enfermedad de Newcastle Ulster 2C	LOTE N°: 01/10
SUMINISTRADOR: Departamento de Patología de aves y otras especies LCV	FECHA DE RECEPCIÓN: marzo 2010
CANTIDAD Y FORMATO: Vial con 300 µl. Liofilizado por Dpto. PCR	FECHA FINAL:
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: En lugar fresco y seco	
LOCALIZACIÓN: Refrigerador EQ/PCR-34	CADUCIDAD: Marzo 2015
VALOR TÉCNICAS NO PCR:	OBSERVACIONES:

MATERIAL USADO PARA DILUIR	FECHA PREPARACIÓN DILUCIÓN	DILUCIÓN	VALOR PCR	EXTRACCIÓN / PCR	OBSERVACIONES (uso, unidades preparadas, volumen,...)
Agua PCR	22-3-2010	-1	27,32 ± 0,23	22-3-2010	Se preparan 35 viales. Para enviar a los Laboratorios de las CCAA
		-2	30,92 ± 0,53		
		-3	33,32 ± 0,52		
		-4	Resultado no repetitivo		

# ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

## MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

 <b>MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO</b>		<b>DIRECCIÓN GENERAL DE ESTABLECIMIENTOS ANIMALES Y GRANJERÍAS</b> <b>SUBDIRECCIÓN REGIONAL DE FOMENTO DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL</b> <b>LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA</b>
<b>CERTIFICADO DE CALIDAD:</b> <b>Laboratorio Nacional de Referencia de INFLUENZA AVIAR</b>		
<b>PRODUCTO:</b>	SV-AIV H6N2-L	
<b>PROCEDENCIA:</b>	Colección Departamento Aves LCV AIV H6N2 Lote 0205	
<b>Nº DE LOTE:</b>	01	
<b>DESCRIPCIÓN/VALOR:</b>	Ct RT-PCR en tiempo real (F5C/PCR-01 + I5C/PCR-16) Puro: 24,81 ± 0,14 Dilución 1/10 <sup>-1</sup> : 28,17 ± 0,39      Dilución 1/10 <sup>-3</sup> : 34,47 ± 0,42 Dilución 1/10 <sup>-2</sup> : 31,33 ± 0,07      Dilución 1/10 <sup>-4</sup> : Señal no repetitiva	
<b>PRESENTACIÓN:</b>	Liofilizado	
<b>CONSERVACIÓN:</b>	Vial liofilizado: en lugar fresco, seco y protegido de la luz. Una vez reconstituido, almacenar los alícuotas a -70 °C.	
<b>FECHA DE PRODUCCIÓN:</b>	2005	
<b>FECHA DE CADUCIDAD:</b>	Septiembre 2015 Una vez reconstituido, debe: - mantenerse a -70 °C en pequeñas alícuotas (deben evitarse descongelaciones numerosas) y - controlarse la estabilidad de la señal de RT-PCR	
<b>USO PREVISTO:</b>	Para utilizar como control positivo de RT-PCR	
<b>INSTRUCCIONES DE USO:</b>	Diluir con 2 ml de agua libre de ARNasas. Ensayar diferentes diluciones para establecer la dilución de uso	
 Fdo.: Elena San Miguel Responsable de Departamento Fecha: 15 de septiembre de 2010		
<small>             Edición de agosto 2010              2010-REC-1-ANM-11              10/08/2010           </small>		

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011  
MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

Para utilizar en las **reacciones de PCR** de detección del genoma de cada microorganismo

1. En el propio laboratorio, LCV
2. Para proporcionar a los laboratorios de la **red de Laboratorios de Sanidad Animal**

## ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

### MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

#### 1. En el propio laboratorio, LCV, en operaciones de control de calidad:

- 1a . Controles de reacción (ensayo en paralelo con muestras de valor asignado)
  - Controles de extracción positivos
  - Controles de amplificación positivos
  
- 1b . Análisis periódico de muestras positivas antiguas o de muestras contaminadas artificialmente

## ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

### MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

2. Para proporcionar a los laboratorios de la **red de Laboratorios de Sanidad Animal**:

2a. Para poner a punto técnicas de PCR transferidas por LCV  
(para la verificación de técnica)

2b. Para utilizar como controles de reacción una vez puesta a  
punto la técnica

- Controles de extracción positivos
- Controles de amplificación positivos

## ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

### MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

#### EN RESUMEN

El Dpto. de PCR “fabrica” **Materiales de Referencia para PCR.**

Este proceso consiste en dar **VALOR DE PCR** a diferentes materiales.

Valor dado por 1 único método: **método utilizado en Dpto. de PCR**  
(acreditado en algunos casos, en otros no)

Parámetro: **Ct, intensidad de banda**

Para uso en el **LCV** o en los **Laboratorios de la Red de Sanidad Animal**

**NO** es un material de referencia certificado (el LCV no es entidad certificadora)

**ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011**  
**MATERIALES DE REFERENCIA. PCR**

**Muchas gracias por su atención**