


| | | |
|---|---|-----------------------------|
|  | MACROPROCESO DE APOYO | CÓDIGO: AAAr113 |
| | PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO | VERSIÓN: 3 |
| | DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL | VIGENCIA: 2017-11-16 |
| | | PAGINA: 1 de 8 |

16-

| | |
|--------------|---------------------------------|
| FECHA | martes, 26 de noviembre de 2019 |
|--------------|---------------------------------|

Señores
UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
 BIBLIOTECA
 Ciudad


| | |
|---|------------------------|
| UNIDAD REGIONAL | Extensión Facativá |
| TIPO DE DOCUMENTO | Trabajo De Grado |
| FACULTAD | Ciencias Agropecuarias |
| NIVEL ACADÉMICO DE FORMACIÓN O PROCESO | Pregrado |
| PROGRAMA ACADÉMICO | Ingeniería Agronómica |

El Autor(Es):

| APELLIDOS COMPLETOS | NOMBRES COMPLETOS | No. DOCUMENTO DE IDENTIFICACIÓN |
|----------------------------|--------------------------|--|
| GUTIERREZ CHIZABAS | SANDRA MILENA | 52.884.011 |
| | | |
| | | |
| | | |

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca
 Teléfono (091) 8281483 Línea Gratuita 018000976000
 www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
 NIT: 890.680.062-2

*Documento controlado por el Sistema de Gestión de la Calidad
 Asegúrese que corresponde a la última versión consultando el Portal Institucional*

| | | |
|---|---|-----------------------------|
|  | MACROPROCESO DE APOYO | CÓDIGO: AAAr113 |
| | PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO | VERSIÓN: 3 |
| | DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL | VIGENCIA: 2017-11-16 |
| | | PAGINA: 2 de 8 |

Director(Es) y/o Asesor(Es) del documento:

| APELLIDOS COMPLETOS | NOMBRES COMPLETOS |
|----------------------------|--------------------------|
| PADILLA GONZALEZ | PEDRO RENALDO |
| VARGAS ROJAS | JUAN MANUEL |
| | |
| | |

| TÍTULO DEL DOCUMENTO |
|---|
| APOYO AL LABORATORIO DE CUARENTENA VEGETAL DE LA SUBDIRECCIÓN DE ANÁLISIS Y DIAGNÓSTICO DEL ICA EN MOSQUERA CUNDINAMARCA. |

| SUBTÍTULO (Aplica solo para Tesis, Artículos Científicos, Disertaciones, Objetos Virtuales de Aprendizaje) |
|---|
| |


| TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Aplica para Tesis/Trabajo de Grado/Pasantía |
|---|
| INGENIERA AGRONOMA |

| AÑO DE EDICION DEL DOCUMENTO | NÚMERO DE PÁGINAS |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 25/11/2019 | 76p |

| DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS (Usar 6 descriptores o palabras claves) | |
|---|-------------------|
| ESPAÑOL | INGLÉS |
| 1. Fitopatología | Phytopathology |
| 2. Patógenos exóticos | Exotic pathogens |
| 3. Plagas cuarentenarias. | Quarantine pests. |
| 4. | |
| 5. | |
| 6. | |

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca
Teléfono (091) 8281483 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
NIT: 890.680.062-2

*Documento controlado por el Sistema de Gestión de la Calidad
Asegúrese que corresponde a la última versión consultando el Portal Institucional*

| | | |
|---|---|-----------------------------|
|  | MACROPROCESO DE APOYO | CÓDIGO: AAAr113 |
| | PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO | VERSIÓN: 3 |
| | DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL | VIGENCIA: 2017-11-16 |
| | | PAGINA: 3 de 8 |

RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS

(Máximo 250 palabras – 1530 caracteres, aplica para resumen en español):

El objetivo de la pasantía fue brindar apoyo al laboratorio de Cuarentena Vegetal de la Subdirección de Análisis y Diagnóstico del ICA en Mosquera Cundinamarca. Laboratorio en el cual ingresa material vegetal de importación y exportación proveniente de los controles fronterizos, además material vegetal para el control fitosanitario de patógenos exóticos en el territorio. Material fue analizado mediante técnicas microbiológicas y moleculares adaptadas según protocolos propios del ICA y protocolos internacionales. Con esto se pretendió evitar la introducción de fitopatógenos exóticos al territorio nacional y la exportación de los propios a otros países. Durante la pasantía se realizaron actividades de apoyo relacionadas con la preparación, análisis y diagnóstico de material vegetal y apoyo a la gestión de calidad.

The objective of the internship was to provide support to the Plant Quarantine laboratory of the Subdirectorate of Analysis and Diagnosis of the ICA in Mosquera Cundinamarca. Laboratory in which import and export plant material from border controls enters, as well as plant material for phytosanitary control of exotic pathogens in the territory. Material was analyzed using microbiological and molecular techniques adapted according to ICA's own protocols and international protocols. With this it was tried to avoid the introduction of exotic phytopathogens to the national territory and the export of the own ones to other countries. During the internship, support activities related to the preparation, analysis and diagnosis of plant material and support for quality management were carried out.

AUTORIZACION DE PUBLICACIÓN

Por medio del presente escrito autorizo (Autorizamos) a la Universidad de Cundinamarca para que, en desarrollo de la presente licencia de uso parcial, pueda ejercer sobre mí (nuestra) obra las atribuciones que se indican a continuación, teniendo en cuenta que, en cualquier caso, la finalidad perseguida será facilitar, difundir y promover el aprendizaje, la enseñanza y la investigación.

En consecuencia, las atribuciones de usos temporales y parciales que por virtud de la presente licencia se autoriza a la Universidad de Cundinamarca, a los usuarios de la Biblioteca de la Universidad; así como a los usuarios de las redes, bases de datos y demás sitios web con los que la Universidad tenga perfeccionado una alianza,

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca
Teléfono (091) 8281483 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
NIT: 890.680.062-2



son:


Marque con una "X":

| AUTORIZO (AUTORIZAMOS) | SI | NO |
|--|-----------|-----------|
| 1. La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer. | | X |
| 2. La comunicación pública por cualquier procedimiento o medio físico o electrónico, así como su puesta a disposición en Internet. | | X |
| 3. La inclusión en bases de datos y en sitios web sean éstos onerosos o gratuitos, existiendo con ellos previa alianza perfeccionada con la Universidad de Cundinamarca para efectos de satisfacer los fines previstos. En este evento, tales sitios y sus usuarios tendrán las mismas facultades que las aquí concedidas con las mismas limitaciones y condiciones. | | X |
| 4. La inclusión en el Repositorio Institucional. | X | |

De acuerdo con la naturaleza del uso concedido, la presente licencia parcial se otorga a título gratuito por el máximo tiempo legal colombiano, con el propósito de que en dicho lapso mi (nuestra) obra sea explotada en las condiciones aquí estipuladas y para los fines indicados, respetando siempre la titularidad de los derechos patrimoniales y morales correspondientes, de acuerdo con los usos honrados, de manera proporcional y justificada a la finalidad perseguida, sin ánimo de lucro ni de comercialización.

Para el caso de las Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía, de manera complementaria, garantizo(garantizamos) en mi(nuestra) calidad de estudiante(s) y por ende autor(es) exclusivo(s), que la Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía en cuestión, es producto de mi(nuestra) plena autoría, de mi(nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi(nuestra) creación original particular y, por tanto, soy(somos) el(los) único(s) titular(es) de la misma. Además, aseguro (aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos de la Tesis o Trabajo de Grado es de mí (nuestra) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Universidad de Cundinamarca por tales aspectos.

Sin perjuicio de los usos y atribuciones otorgadas en virtud de este documento, continuaré (continuaremos) conservando los correspondientes derechos

| | | |
|---|---|--|
|  | MACROPROCESO DE APOYO | CÓDIGO: AAAR113 |
| | PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO | VERSIÓN: 3 |
| | DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL | VIGENCIA: 2017-11-16 PAGINA: 5 de 8 |

patrimoniales sin modificación o restricción alguna, puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación de los derechos patrimoniales derivados del régimen del Derecho de Autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “*Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores*”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables. En consecuencia, la Universidad de Cundinamarca está en la obligación de RESPETARLOS Y HACERLOS RESPETAR, para lo cual tomará las medidas correspondientes para garantizar su observancia.

NOTA: (Para Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía):

Información Confidencial:

Esta Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía, contiene información privilegiada, estratégica, secreta, confidencial y demás similar, o hace parte de la investigación que se adelanta y cuyos resultados finales no se han publicado. **SI NO** .

En caso afirmativo expresamente indicaré (indicaremos), en carta adjunta tal situación con el fin de que se mantenga la restricción de acceso.

LICENCIA DE PUBLICACIÓN


Como titular(es) del derecho de autor, confiero(erimos) a la Universidad de Cundinamarca una licencia no exclusiva, limitada y gratuita sobre la obra que se integrará en el Repositorio Institucional, que se ajusta a las siguientes características:

a) Estará vigente a partir de la fecha de inclusión en el repositorio, por un plazo de 5 años, que serán prorrogables indefinidamente por el tiempo que dure el derecho patrimonial del autor. El autor podrá dar por terminada la licencia solicitándolo a la Universidad por escrito. (Para el caso de los Recursos Educativos Digitales, la Licencia de Publicación será permanente).

b) Autoriza a la Universidad de Cundinamarca a publicar la obra en formato y/o soporte digital, conociendo que, dado que se publica en Internet, por este hecho circula con un alcance mundial.

c) Los titulares aceptan que la autorización se hace a título gratuito, por lo tanto, renuncian a recibir beneficio alguno por la publicación, distribución, comunicación pública y cualquier otro uso que se haga en los términos de la presente licencia y

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca
Teléfono (091) 8281483 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
NIT: 890.680.062-2

| | | |
|---|---|-----------------------------|
|  | MACROPROCESO DE APOYO | CÓDIGO: AAAr113 |
| | PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO | VERSIÓN: 3 |
| | DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL | VIGENCIA: 2017-11-16 |
| | | PAGINA: 6 de 8 |

de la licencia de uso con que se publica.

d) El(Los) Autor(es), garantizo(amos) que el documento en cuestión, es producto de mi(nuestra) plena autoría, de mi(nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi (nuestra) creación original particular y, por tanto, soy(somos) el(los) único(s) titular(es) de la misma. Además, aseguro(aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos es de mí (nuestro) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Universidad de Cundinamarca por tales aspectos.

e) En todo caso la Universidad de Cundinamarca se compromete a indicar siempre la autoría incluyendo el nombre del autor y la fecha de publicación.

f) Los titulares autorizan a la Universidad para incluir la obra en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

g) Los titulares aceptan que la Universidad de Cundinamarca pueda convertir el documento a cualquier medio o formato para propósitos de preservación digital.

h) Los titulares autorizan que la obra sea puesta a disposición del público en los términos autorizados en los literales anteriores bajo los límites definidos por la universidad en el “Manual del Repositorio Institucional AAAM003”

i) Para el caso de los Recursos Educativos Digitales producidos por la Oficina de Educación Virtual, sus contenidos de publicación se rigen bajo la Licencia Creative Commons: Atribución- No comercial- Compartir Igual.




j) Para el caso de los Artículos Científicos y Revistas, sus contenidos se rigen bajo la Licencia Creative Commons Atribución- No comercial- Sin derivar.



Nota:

Si el documento se basa en un trabajo que ha sido patrocinado o apoyado por una


| | | |
|---|---|-----------------------------|
|  | MACROPROCESO DE APOYO | CÓDIGO: AAAr113 |
| | PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO | VERSIÓN: 3 |
| | DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL | VIGENCIA: 2017-11-16 |
| | | PAGINA: 7 de 8 |

entidad, con excepción de Universidad de Cundinamarca, los autores garantizan que se ha cumplido con los derechos y obligaciones requeridos por el respectivo contrato o acuerdo.


La obra que se integrará en el Repositorio Institucional, está en el(los) siguiente(s) archivo(s).

| Nombre completo del Archivo Incluida su Extensión (Ej. PerezJuan2017.pdf) | Tipo de documento (ej. Texto, imagen, video, etc.) |
|--|---|
| 1. APOYO AL LABORATORIO DE CUARENTENA VEGETAL DE LA SUBDIRECCIÓN DE ANÁLISIS Y DIAGNÓSTICO DEL ICA EN MOSQUERA CUNDINAMARCA. | texto |
| 2. | |
| 3. | |
| 4. | |

En constancia de lo anterior, Firmo (amos) el presente documento:

| APELLIDOS Y NOMBRES COMPLETOS | FIRMA (autógrafa) |
|--------------------------------------|--|
| GUTIERREZ CHIZABAS SANDRA MILENA |  |
| | |
| | |
| | |

12.1.40

| | | |
|---|---|-----------------------------|
|  | MACROPROCESO DE APOYO | CÓDIGO: AAAr113 |
| | PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO | VERSIÓN: 3 |
| | DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL | VIGENCIA: 2017-11-16 |
| | | PAGINA: 8 de 8 |

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca
Teléfono (091) 8281483 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
NIT: 890.680.062-2

*Documento controlado por el Sistema de Gestión de la Calidad
Asegúrese que corresponde a la última versión consultando el Portal Institucional*

Apoyo al Laboratorio de Cuarentena Vegetal de la Subdirección de Análisis y Diagnóstico del
ICA en Mosquera Cundinamarca

Sandra Milena Gutiérrez Chizabas

Universidad de Cundinamarca
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Ingeniería Agronómica
Agosto 2019.

Apoyo al Laboratorio de Cuarentena Vegetal de la Subdirección de Análisis y Diagnóstico del
ICA en Mosquera Cundinamarca

Informe Final del Trabajo de grado en modalidad Pasantía para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo

Pasante: Sandra Milena Gutiérrez Chizabas

Tutor externo: Juan Manuel Vargas Rojas

Tutor interno: Pedro Renaldo Padilla González

Universidad de Cundinamarca
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Ingeniería Agronómica
Agosto 2019.

Nota de Aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Facatativá, 14 de octubre de 2019

Contenido

| | |
|--|----|
| RESUMEN EJECUTIVO | 5 |
| ABSTRACT | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios LANIP | 9 |
| Laboratorio de Cuarentena Vegetal | 9 |
| LCV | 9 |
| Laboratorio nacional de tratamientos Cuarentenarios | 9 |
| LNTC | 9 |
| Bioterio LANIP | 9 |
| Invernaderos de estación de Cuarentena Vegetal | 9 |
| Laboratorio Nacional de Análisis de semillas | 9 |
| OBJETIVO GENERAL | 11 |
| MARCO TEÓRICO | 12 |
| METODOLOGÍA | 16 |
| FASE PREANALÍTICA | 16 |
| FASE ANALÍTICA | 21 |
| IMPLEMENTACIÓN DE REQUISITOS DE LA NORMA ISO/IEC 17025 Y SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN EL LABORATORIO | 32 |
| RESULTADOS | 35 |
| FASE PREANALÍTICA | 35 |
| FASE ANALÍTICA | 39 |
| | 43 |
| | 43 |
| IMPLEMENTACIÓN DE REQUISITOS DE LA NORMA ISO/IEC 17025 Y SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN EL LABORATORIO | 44 |
| | 45 |
| | 46 |
| ANÁLISIS DE RESULTADOS | 46 |
| FASE PREANALÍTICA | 46 |
| FASE ANALÍTICA | 47 |
| CONCLUSIONES | 50 |
| RECOMENDACIONES | 52 |
| BIBLIOGRAFÍA | 53 |
| ANEXOS | 55 |

Lista de Anexos

Anexo 1: Preparación de medios, soluciones y gel de agarosa empleados en el LCV

Anexo 2: Metodologías para extracción de Nematodos

Anexo 3: Realización de impronta para observar estructuras de hongos y oomycetes

Anexo 4: Montaje de microcultivos para hongos

Anexo 5: Diluciones para montaje de bacterias

Anexo 6: Tinción Gram para bacterias

Anexo 7: Métodos de Extracción de ADN y ARN empleados en el LCV

Anexo 8: Metodología para PCR

Anexo 9: Compromiso de confidencialidad firmado en Pasantía

RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo de la pasantía fue brindar apoyo al laboratorio de Cuarentena Vegetal de la Subdirección de Análisis y Diagnóstico del ICA en Mosquera Cundinamarca. Laboratorio en el cual ingresa material vegetal de importación y exportación proveniente de los controles fronterizos, además material vegetal para el control fitosanitario de patógenos exóticos en el territorio. Material fue analizado mediante técnicas microbiológicas y moleculares adaptadas según protocolos propios del ICA y protocolos internacionales. Con esto se pretendió evitar la introducción de fitopatógenos exóticos al territorio nacional y la exportación de los propios a otros países. Durante la pasantía se realizaron actividades de apoyo relacionadas con la preparación, análisis y diagnóstico de material vegetal y apoyo a la gestión de calidad.

Palabras claves: Fitopatología, patógenos exóticos, plagas cuarentenarias.

ABSTRACT

The objective of the internship was to provide support to the Plant Quarantine laboratory of the Subdirectorate of Analysis and Diagnosis of the ICA in Mosquera Cundinamarca. Laboratory in which import and export plant material from border controls enters, as well as plant material for phytosanitary control of exotic pathogens in the territory. Material was analyzed using microbiological and molecular techniques adapted according to ICA's own protocols and international protocols. With this it was tried to avoid the introduction of exotic phytopathogens to the national territory and the export of the own ones to other countries. During the internship, support activities related to the preparation, analysis and diagnosis of plant material and support for quality management were carried out.

Keywords: Phytopathology, exotic pathogens, quarantine pests.

INTRODUCCIÓN

La pasantía se lleva a cabo en el laboratorio de Cuarentena Vegetal (denominado en adelante como **LCV**), pertenece al Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Es uno de los laboratorios de la Dirección Técnica de Análisis y Diagnóstico Agrícola.

Este laboratorio fue ubicado en lo que se conoce como el complejo LANIP, un grupo de Laboratorios pertenecientes al ICA ubicados en límites entre el Municipio de Madrid y Mosquera en el Departamento de Cundinamarca. En este complejo se encuentran los siguientes laboratorios:

- Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios LANIP: dedicado al análisis de medicamentos, productos biológicos, alimentos balanceados, sales mineralizadas y material de reproducción animal que se comercializa en el país. Este a su vez cuenta con un bioterio de cría de especies menores para ensayos.
- Laboratorio Nacional de Semillas LANASE: donde se evalúa la calidad de las semillas comercializadas en el territorio nacional.
- Laboratorio Nacional de Tratamientos Cuarentenarios LNTEC: aquí evalúan tratamientos cuarentenarios para mitigación de plagas.
- Laboratorio de Cuarentena Vegetal: donde se analiza material de propagación proveniente de puertos y del territorio nacional con el fin de evaluar que este se encuentre libre de enfermedades cuarentenarias.

El LCV y el LNTEC se encuentran en zona rural aislada de la población y de cultivos grandes, así como de zonas boscosas; esto con el fin de evitar cualquier tipo de contacto de posibles fitopatógenos exóticos que puedan provenir de las muestras analizadas. Alrededor del complejo de Cuarentena se encuentran arboles de acacias y eucaliptos como barreras vivas entre este y el ambiente exterior; igualmente al interior de los laboratorios se cuenta

con medidas de seguridad adicionales como puertas dobles, zonas de cambio, zonas de contención, duchas de lavado, y algunas prácticas como evitar el transporte de instrumentos y/o materiales dentro y fuera de los laboratorios. Además se adecuaron las instalaciones según el manejo de las muestras y su paso de un área de más posible contaminación a otra de menor.

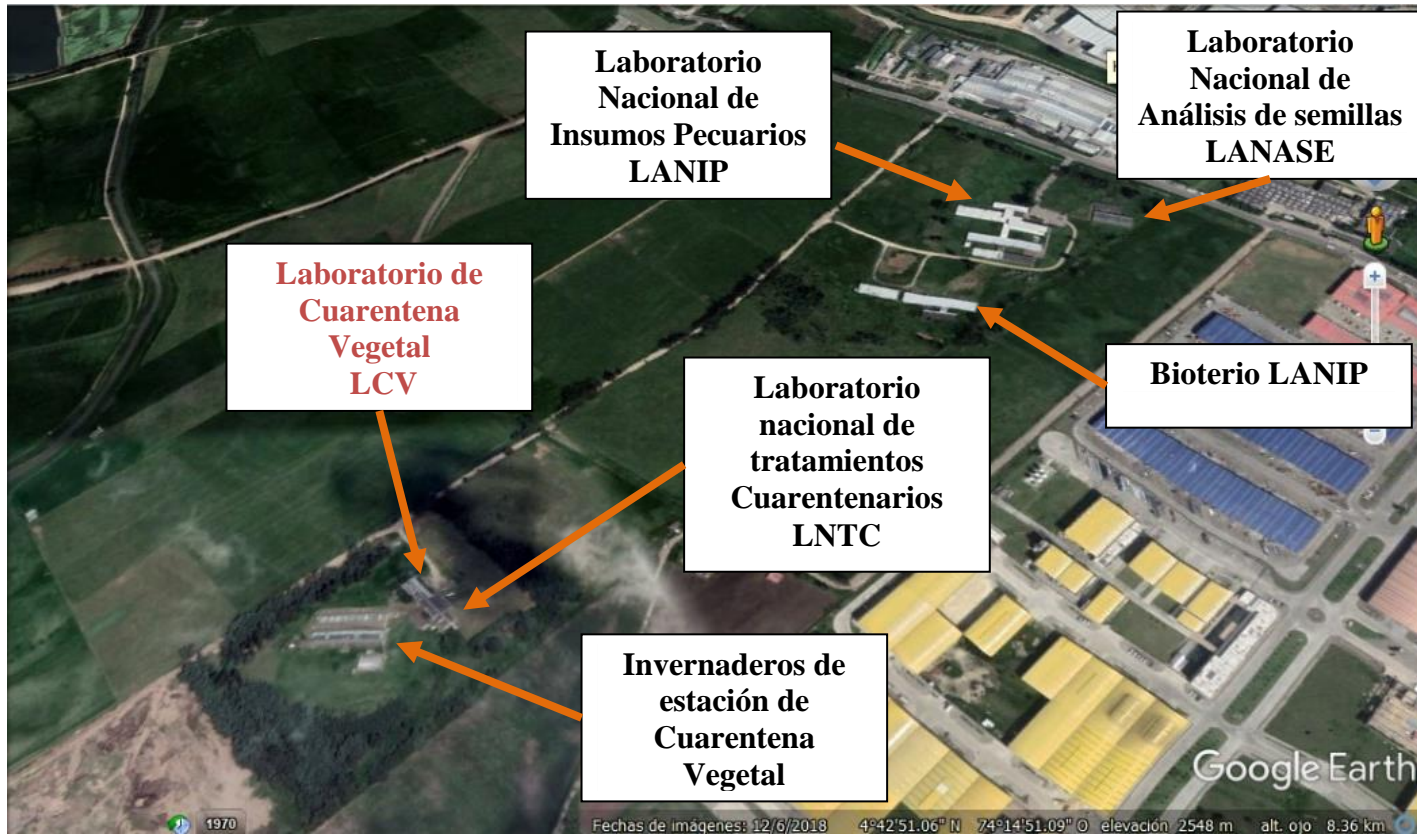
Es importante aclarar que en el **LCV NO SE REALIZA INVESTIGACIÓN DE NINGÚN TIPO, NI SE APLICAN DISEÑOS EXPERIMENTALES O TRATAMIENTOS A LAS MUESTRAS O VARIABLES.** Se enfocan al **ANÁLISIS** que básicamente es la detección de microorganismos solicitados de forma específica por el cliente con resultados como detectable o no detectable y muy eventualmente también al **DIAGNÓSTICO** que es determinar qué tipo de microorganismo pueden estar afectando el cultivo, para esto el reporte de resultados llevaría el nombre en específico de los microorganismos fitopatógenos encontrados en la muestra. Este laboratorio recibe muestras de germoplasma importado de diferentes países, y material vegetal que se pretende exportar, con el fin de verificar que cumplen con los requisitos fitosanitarios y que son específicos para cada especie vegetal y para cada país. La labor que se lleva a cabo en el LCV es de gran importancia debido a que mediante sus análisis se evita el ingreso de patógenos exóticos al país.

Las muestras que ingresan al LCV generalmente son recolectadas por los funcionarios de la Subgerencia de Protección Fronteriza en puertos, aeropuertos y pasos fronterizos. Actualmente el LCV también recibe muestras provenientes de la Subdirección de Protección Vegetal ya que es competencia de ellos ejercer controles dentro del territorio nacional en materia sanidad agrícola, esta subdirección envía muestras provenientes de las brigadas para el control de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Raza 4 Tropical (FocR4T) y demás muestras que se estimen convenientes.

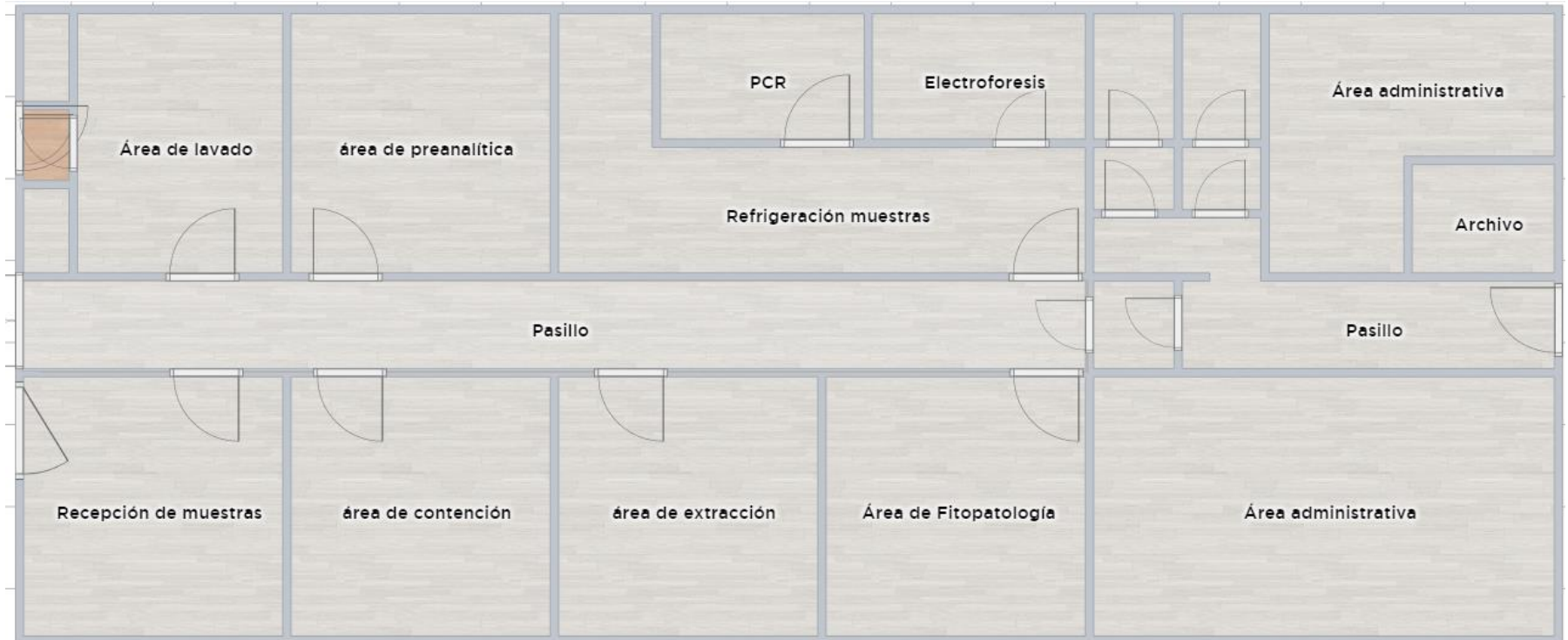
En el laboratorio de LCV se realizan análisis y diagnóstico de germoplasma sexual (semillas) o asexual (bulbos, estolones, colinos, esquejes), también de tejido proveniente de tallos, hojas y raíces, con el fin de determinar la presencia de hongos, bacterias, nematodos o virus, según sea el tipo de patógeno exótico solicitado para cada muestra. Estas determinaciones se hacen por medio de pruebas microbiológicas, pruebas bioquímicas, y pruebas moleculares.

En caso de detectarse algún Fitopatógeno en la carga de material vegetal, se restringe su uso ya sea para importación o exportación. Si se detecta en cultivos nacionales se procede a tomar medidas de contención para evitar su diseminación en el territorio.

Al ser patógenos exóticos se deben seguir y adaptar protocolos de detección internacionales, **pero no se aplican diseños experimentales a las muestras ingresadas, por tanto, en este documento no aplica el manejo estadístico de las mismas.**



Grupo de Laboratorios del complejo LANIP donde se ubica también el Laboratorio de Cuarentena Vegetal donde se llevó a cabo la práctica. . Imagen modificada de Google Earth, 2018.



Estructura general de las áreas internas del Laboratorio de Cuarentena Vegetal. Autor, 2019. Las muestras ingresan por el área de recepción de muestras y avanzan por las áreas de izquierda a derecha.

OBJETIVO GENERAL

Brindar apoyo al Laboratorio de Cuarentena Vegetal de la Subdirección de Análisis y Diagnóstico del ICA en Mosquera Cundinamarca

Objetivos Específicos

- Describir y aplicar las actividades desarrolladas en la fase preanalítica con el fin de facilitar el análisis y diagnóstico de las muestras en el laboratorio.
- Reconocer las actividades de la fase analítica para así desarrollar los análisis y diagnósticos adecuados en el laboratorio.
- Participar en acciones encaminadas a la implementación de requisitos de la norma ISO/IEC 17025 y sistemas de gestión de calidad en el laboratorio.

MARCO TEÓRICO

La apertura de comercios internacionales, el tráfico internacional de material vegetal, la disminución de algunas barreras fitosanitarias entre países, la inadecuada certificación de material vegetal libre de infección, algunas leyes ineficaces y la homogeneidad generalizada en los cultivos, ha permitido el establecimiento y dispersión de patógenos introducidos. Una vez estos entran en relación con plantas huésped pueden ocasionar daños graves ya que estas plantas no han coevolucionado con los mismos y no han desarrollado mecanismos de detección, defensa o resistencia, quedando a merced del patógeno. Este a su vez al ser introducido en una nueva área geográfica puede incluso generar híbridos interespecíficos que expresan nuevas capacidades patogénicas. (Díaz, 2017)

A continuación, se relacionan algunas características generales encontradas en organismos fitopatógenos:

Hongos Fitopatógenos: Cerca de 8.000 especies se consideran hongos fitopatógenos, estableciendo relación con la planta. Son microorganismos microscópicos eucarióticos, de pared celular compuesta por quitina, celulosa o ambas, carentes de clorofila. Producen esporas y estructuras ramificadas llamadas hifas que pueden o no tener paredes transversales (septos). Se desarrollan generalmente en sitios húmedos y de poca luz. Un micelio puede llegar a sobrevivir entre los -5 a 45°C, las esporas en su mayoría resisten rangos muy amplios de humedad y temperatura para sobrevivir, pero para germinar si necesitan condiciones óptimas según la especie (Agrios, 2005).

Phytophthora: es un Oomycete con capacidad saprofítica (se alimentan de materia orgánica muerta), por tanto sobrevive en el suelo o en residuos de cosechas. Su colonia se observa de color blanco o crema. Presenta hifas sin septos de color coraloide. En su fase sexual sin ambiente favorable produce oosporas, llegando a producir órganos de resistencia como clamidosporas. En condiciones favorables produce conidios que en humedades altas

produce esporangios con producción de zoosporas que se diseminan. Presentan anteridios y oogonios que sirven para su clasificación. (Aristizábal & Torres, 2015).

Fusarium: Son hongos saprofitos distribuidos en el suelo y plantas a las que ataca cuando se encuentran débiles o desbalanceadas. Se dispersa en el suelo, agua y material infectado, sobrevive largos periodos en el suelo gracias a las clamidosporas que presentan doble pared gruesa, también presenta fiálides presenta forma de botella, los macroconidios tienen forma de media luna o canoa, hialinos y septados. Su colonia es de color blanco, con pigmentos en su revés, se desarrolla mejor en PDA pues este medio permite observar bien su diámetro, morfología y pigmento, pero es en el medio CLA que permite el desarrollo de conidios. (Tapia & Amaro, 2014)

Plasmopara: Son oomycetes. Este género son parásitos obligados conocidos algunos como mildiu. Forma ramificaciones de esporangios, *Plasmopara hastedii* se evidencia después de la germinación de la semilla mostrando esporas de color blanco en sus cotiledones. Muestra zoosporangios y esporangioforos de formas ovales y redondas. (Sakr, 2015)

Alternaria: son hongos que forman colonias de color marrón, gris humo o verde oliva, de este mismo color son sus hifas septadas, se reproducen por conidias pluricelulares obloides y septadas que forman cadenas o en solitario. (Fabrega, Agut, & Calvo, 2002)

Bacterias Fitopatógenas: Microorganismos microscópicos, su ADN está disperso en el citoplasma, algunas pueden ser fotosintéticas, pero sin cloroplastos (la clorofila se encuentra en el citoplasma) Causan menor número de enfermedades, con menores daños comparadas con los hongos. (Arauz, 1998). Generalmente tiene forma de bastón que dependiendo la temperatura del cultivo pueden alargar su forma, algunas pocas son filamentosas. En su mayoría tiene la pared celular recubierta ya sea con una capa mucilaginosa o con una capsula. Y en su mayoría presentan flagelos (Agrios, 2005).

Virus Fitopatógenos: Son nucleoproteínas más pequeñas que las bacterias, con comportamiento parecidos a seres vivos, pero también como molécula química. Todos son parásitos que se activan cuando entran en contacto con células vivas, por tanto, son patógenos obligados que no pueden ser mantenidos en medios de cultivos. De 2000 virus conocidos cerca de 500 son patógenos de plantas. Un virus puede infectar varias plantas y una misma planta puede ser afectada por varios virus. Contienen ADN o ARN nunca ambos, no poseen estructuras de reproducción ya que esta se lleva a cabo induciendo a las células de las plantas a producir el material del virus (Agrios, 2005). Cada virus solo se transmite por un tipo de vector específico, pero un vector si puede transmitir varios virus. (SAP, 2019)

Nematodos Fitopatógenos: Son animales microscópicos vermiformes, no segmentados, transparentes, cubiertos de cutícula hialina, sin apéndices. Presentan un estilete que es un órgano en punta, ya sea hueco o no por donde extraen las células y nutrientes de las plantas (Agrios, 2005). Son patógenos de difícil control. Su daño en las plantas depende de la densidad de la población, las condiciones ambientales, la susceptibilidad de la planta. (Talavera, 2003).

Aphelenchoides: en este género se encuentran los nematodos foliares causantes de necrosis y deformación en hojas. Dentro de este se encuentra *Aphelenchoides ritzemabosi* que parasite los brotes de las hojas alimentandose del mesófilo. Este género se identifica mediante caracteres morfológicos de adultos con la presencia de un metacarpus esférico, redondo rectangular que ocupa la mayor parte del cuerpo, con un tamaño entre 0,2 a 1,3mm de longitud, con estilete delgado, machos con espícula bien desarrollada y bursa ausente. Macho con forma de bastón y hembra arqueada. (Luna , Olave, Lopez, Cardona, & Alzate, 2018)

Pratylenchus: se les conoce como nematodos lesionadores, presenta cabeza plana y estilete corto y oscuro, el esófago traslapa con el intestino, los machos son más pequeños que las

METODOLOGÍA

El Laboratorio de Cuarentena Vegetal se encuentra ubicado en el km 19 carretera de Occidente, a 0451° Latitud Norte y 7413° de Longitud W, con una altura de 2554 msnm, temperatura media de 14°C y una precipitación de 668 mm/año. A continuación, se relaciona cada una de las metodologías que se llevaron a cabo durante la pasantía en el Laboratorio de Cuarentena Vegetal del ICA.

FASE PREANALITICA

a. Diligenciamiento y manejo de datos asociados a las muestras

El proceso se inicia cuando llegan las muestras al laboratorio LCV, estas proceden generalmente de Subgerencia de Protección Fronteriza, de la Subgerencia de Protección Vegetal o de clientes externos que contratan los servicios. Las muestras son recibidas por las auxiliares quienes revisan que la muestra cumpla con los requisitos técnicos generales y administrativos (documentación). Posteriormente los analistas revisan el cumplimiento de los requisitos técnicos específicos. Finalmente se informa al encargado del Laboratorio, quién asigna el código de identificación del laboratorio, el cual se registra en la muestra y en la forma “Solicitud de Análisis y Diagnóstico”, así mismo se registra la fecha de llegada y el responsable de la recepción.

Seguidamente se lleva a cabo el ingreso de los datos asociados a la forma “Solicitud de Análisis y Diagnóstico” en la matriz de radicación de muestras y se registra el código interno de la muestra, a la vez que se genera la respectiva hoja de ruta, mediante la forma “Hoja de Ruta: Análisis de muestras para diagnostico fitosanitario”, en esta se asigna el analista y evidencia toda la cadena de custodia de la muestra durante su análisis en el laboratorio, desde que se ingresa hasta que se emite el reporte de resultados.

Se llevó a cabo el apoyo para el registro de las muestras ingresadas en la matriz para registro de muestras, información procedente de la forma “Solicitud de Análisis y Diagnóstico”, lo cual agilizo el proceso de ingreso y generación de hojas de ruta atrasadas.

Se propuso el empleo de la herramienta Microsoft Access para el manejo de una base de datos asociado a las muestras con el que se pretendía agilizar la creación de las hojas de ruta ya que una vez ingresados los datos de las muestras estos se podían exportar a un formulario hoja de ruta, lo que evita digitar nuevamente la información agilizando este proceso. Igualmente, la creación de un formulario para el ingreso de datos de las muestras, lo que permitía el ingreso de las mismas sin que el usuario tuviera acceso a toda la información, lo cual respaldaba la confiabilidad en el manejo de las muestras. Pero fue imposible la consecución del programa en el tiempo de pasantía ya que se debe someter su compra a una serie de evaluaciones por parte del personal administrativo.

b. Preparación de medios de cultivo y soluciones

El analista solicita el apoyo requerido a los auxiliares en cuanto a las actividades de preanalítica como: preparación de medios, soluciones de desinfección, reactivos, material estéril, procesamiento de muestras y seguimiento a los equipos del laboratorio.

En cuanto a preparación de medios de cultivo para hongos, bacterias y pruebas bioquímicas para bacterias. Estos tienen en común que se debe seguir el siguiente procedimiento:

- Revisión de las condiciones de preparación sugeridas por el fabricante en el empaque, generalmente allí aparece que cantidad (g) de medio que se debe añadir por litro de agua, el agua empleada es agua destilada. Se pesa esa cantidad y se disuelve.

- Calentar hasta ebullición por triplicado. Esto disuelve muy bien el medio.
- Tapar con papel aluminio y colocar cinta indicadora de esterilización.
- Autoclavar a 121°C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y servir, ya sea en cajas de Petri o en tubos tapa rosca. Usando la cabina de flujo limpia y con mecheros encendidos.
- Dejar enfriar y registrar número de lote, fecha de preparación y reservar 4 cajas para control biológico de medios, las demás se reservan para uso.

Durante la pasantía se adquirieron los conocimientos para la preparación de los siguientes medios y soluciones empleadas en el Laboratorio de Cuarentena Vegetal, la metodología completa para la preparación de cada uno se encuentra en el Anexo1:

1. Preparación de medio PDA + Antibiótico Cloranfenicol (preparación para 1 L)
2. Preparación de solución de Antibiótico Cloranfenicol (preparación para 10 mL)
3. Preparación de medio Agar- Agar (preparación para 1 L)
4. Preparación de medio CLA (Clavel)
5. Preparación de medio SNA (preparación para 1 L)
6. Preparación de medio Nutritivo (preparación para 1 L)
7. Preparación de SIM medio (preparación para 50 mL)
8. Preparación de Agar Urea Base (preparación para 50 mL)
9. Preparación de TSI (preparación para 50 mL)
10. Preparación de Agar Citrato (preparación para 50 mL)
11. Medio PVLG para montaje permanente de microcultivos de hongos (preparación para 50 mL)

Para Extracción

Las soluciones para extracción son reactivos que deben ser preparados con agua ultrapura, certificada como libre de DNAsas y RNAsas, la mayoría de los compuestos son químicos

solidos por tanto necesitan ser diluidos en esta agua. Y en su mayoría se deben autoclavar y almacenar en refrigeración (2 a 8°C) o a temperatura ambiente, otros deben ser ajustados en su pH como el Tris, EDTA y el Acetato de Potasio. La metodología completa para su preparación completa también hace parte del Anexo 1. Durante la pasantía se aprendió a preparar las siguientes soluciones empleadas en la extracción de ADN:

1. Preparación de solución D-Sorbitol 1M (preparación para 100 mL)
2. Preparación de solución Tris 1M (preparación para 100 mL)
3. Preparación de solución EDTA 0,5 M (preparación para 100 mL)
4. Preparación de solución CTAB 0,2M (preparación para 100 mL)
5. Preparación de solución Beta-mercaptoetanol 10 % (preparación para 10 mL)
6. Preparación de solución N-Lauroilsarconin sal de sodio 5% (preparación para 50 mL)
7. Preparación de solución Acetato de Potasio 5M (preparación para 50 mL)

Para PCR

El método de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) necesita varios componentes, entre estos tenemos

1. Buffer
2. MgCl₂
3. Primer's forward y reverse
4. dNTP's
5. Taq Polimerasa

Los componentes de la PCR son separados por alícuotas en tubos eppendorf de 1,5 mL, para evitar la congelación (-20°C) y descongelación en repetidas ocasiones con lo cual se

cortan en fracciones muy pequeñas y se meten en bolsas sellables, que van a congelador de -20°C . En el caso de hojas más desarrolladas, se les extrae la nervadura central y esta es troceada, se congela también a -20°C para su posterior análisis.

Procesamiento de muestras nematodos:

Son muestras generalmente de suelo, hojas o raíces ya que es allí donde se desarrollan este tipo de organismos, por ejemplo, *Xiphinema* sp es ectoparásito por tanto no invade la planta ya que se alimenta de la raíz y de los pelos radicales por tanto es conveniente su montaje a partir de suelo y raíces. Pero es el analista quien decide el tratamiento de la muestra y el montaje a realizar de acuerdo al procedimiento definido, ya sea este por el método de embudo Baerman o por la prueba de tamices de Cobb's. Para la prueba de tamices generalmente el tamiz de **500 μ** y **350 μ** retiene nematodos muy grandes y hasta del tamaño de *Xiphinema* sp, el tamiz de **175 μ** retiene nematodos de tamaño mediano y el tamiz de **100 μ** retiene los más pequeños como *Pratylenchus* sp. Y tamices de **50 μ** retiene juveniles. El montaje de la muestra es apoyado por el auxiliar del laboratorio. Posteriormente el analista realiza la extracción de los nematodos (3 días después del montaje) y lleva a cabo su identificación por medio de análisis microscópico. Las dos metodologías empleadas se encuentran descritas en (Shurtleff & Averre, 1997) y hacen parte del Anexo 2.

FASE ANALÍTICA

Una vez finaliza la fase pre analítica el analista revisa el método estandarizado y/o validado, ya aplicado en el LCV para determinado patógeno exótico. De ser necesario se recurre a la aplicación de métodos referenciados en investigaciones indexadas de organismos internacionales como la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), Journal of Virology, ISTA, entre otros. En caso de requerirse algún recurso adicional el encargado del Laboratorio hace el requerimiento.

a. Metodología para el análisis de Hongos y Oomycetes

Selección del tejido: Se seleccionan material ya sea sintomático o asintomático, muy rara vez llega al LCV materia sintomático. Si es sintomático se selecciona tejido con lesiones leves, no se selecciona tejido con necrosis muy avanzada ya que el avance extremo del hongo también supone el ingreso de organismos saprófitos o secundarios y la idea es obtener el hongo lo más puro posible. En el caso de tejido foliar, se toman explantes de aproximadamente 0.5 cm², con mitad de tejido afectado y mitad de tejido sano para que el hongo tenga tejido de que seguirse alimentando durante la siembra en medio de cultivo. Si se trata de tejido vascular o de raíces se dejan explantes de aproximadamente 0,5 cm de largo.

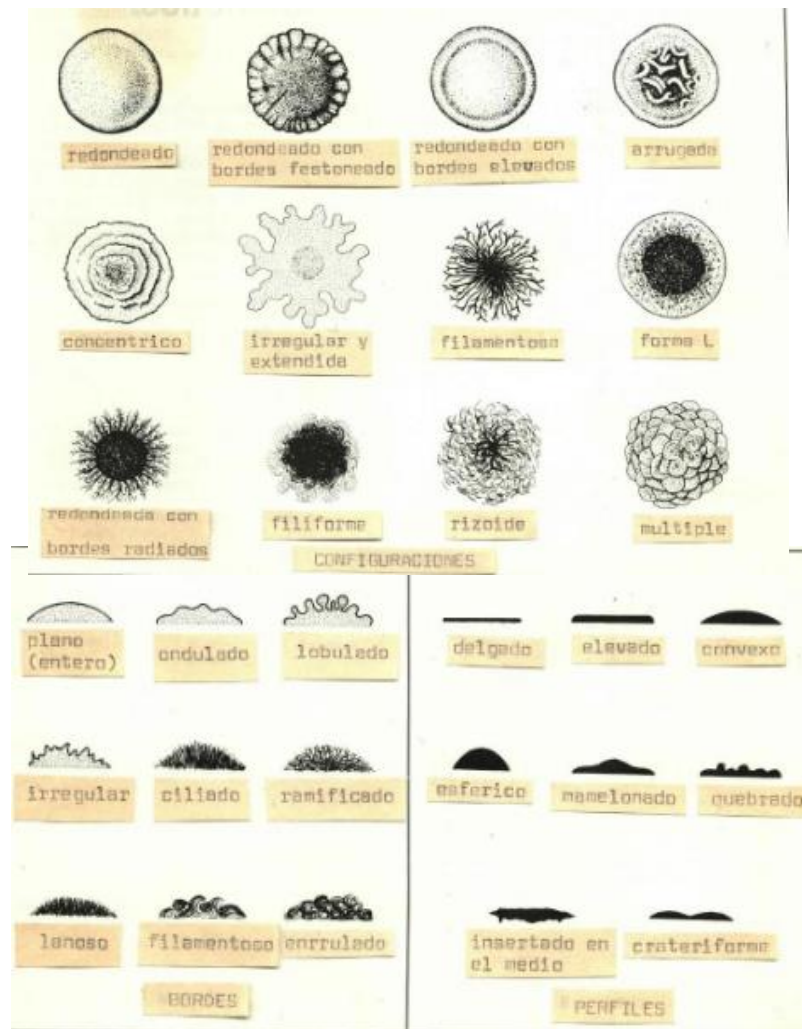
Desinfección de tejido: Se realiza en cabina de flujo laminar, previamente desinfectada y con mecheros prendidos. Tanto el tipo, como la concentración del desinfectante y el tiempo de contacto son determinados según lo indicado por literatura consultada. Generalmente se emplean soluciones diluidas de hipoclorito de sodio que luego son enjuagadas por triplicado con agua destilada estéril. Posteriormente se dejan secar muy bien junto al mechero.

Siembra en agar PDA: Se realiza en cabina de flujo laminar (con las mismas condiciones para la desinfección). Se colocan cinco explantes por caja, dejando distancia entre ellos. Se tapa y se sella con papel parafilm. Cabe recordar que los Oomycetes no son hongos y por lo tanto presentan unas condiciones diferentes para su desarrollo, por lo que algunos requieren medios específicos en su siembra e incluso algunos necesitan de tejido vivo para su desarrollo, así que el manejo depende del patógeno específico a determinar.

Incubación: Las cajas con los explantes sembrados se llevan a incubación durante un mínimo de 7 días a una temperatura de 25°C +/- 2. Se realiza revisión periódica a partir del tercer día de incubación para observar posible crecimiento de estos microorganismos.

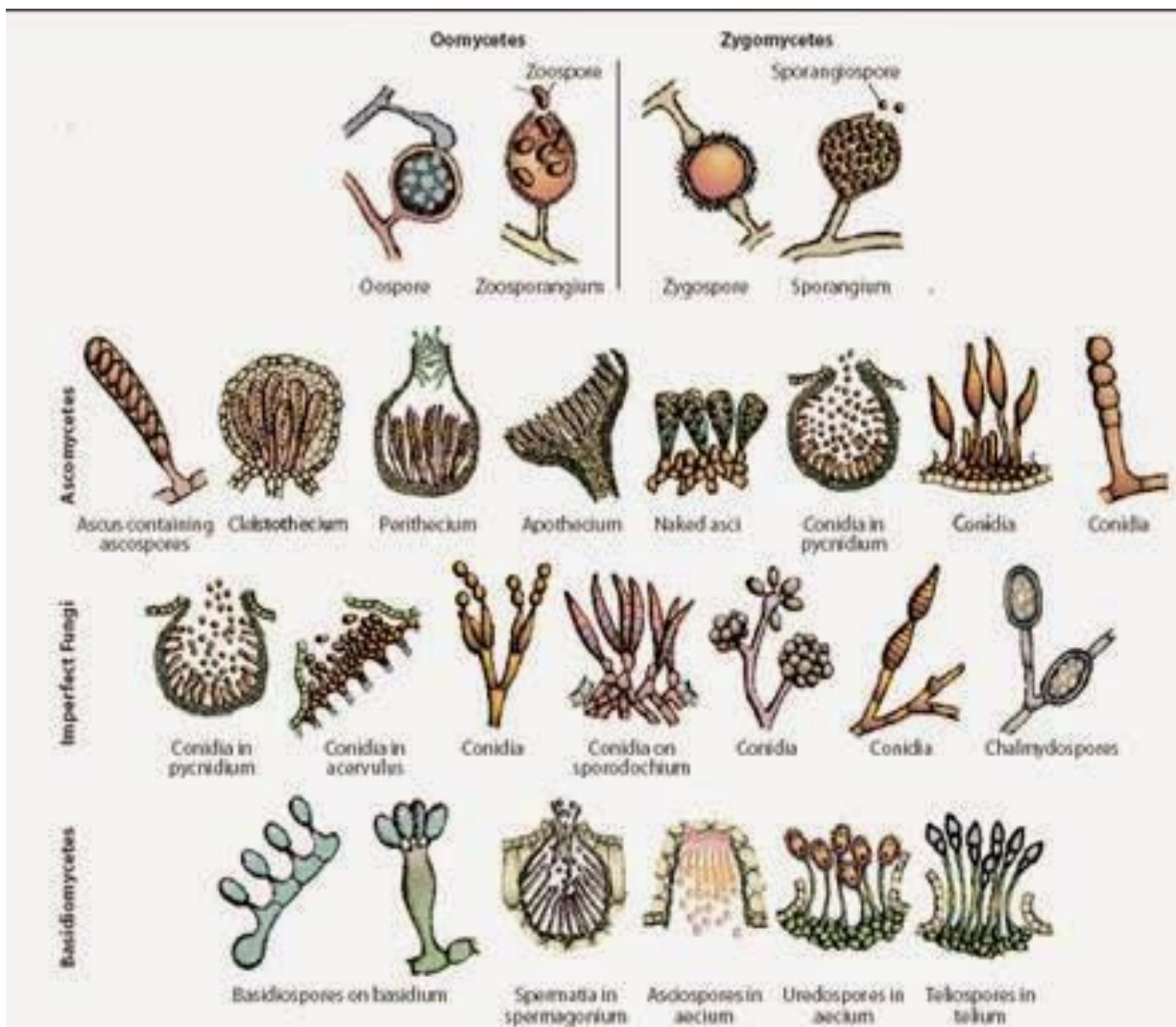
Una vez se tiene desarrollo del hongo u oomycete se procede a un tamizaje inicial por caracteres morfológicos de la colonia como:

- Configuración o Forma
- Textura
- Su borde
- Su perfil o elevación



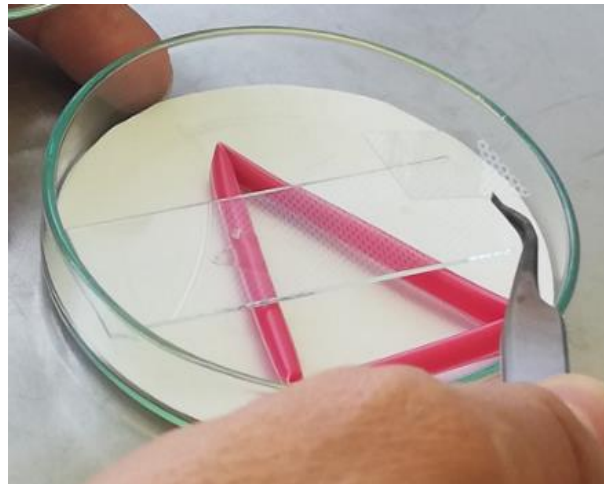
Morfología de colonias para hongos y bacterias. Tomado de: <https://docplayer.es/76846033-Carpeta-de-mesa-area-microbiologia.html>

Si hay sospecha o indicio de que la colonia puede pertenecer a la especie a determinar se procede a hacer impronta con tinción de azul de lactofenol, que permite ver las hifas y algunas estructuras, esta metodología se encuentra detallada en el Anexo 3. Esta revisión se hace por medio del microscopio y según el patógeno a determinar se revisa si las hifas presentan septos o tabiques, pigmentación, a su vez se observa si presentan esporas y/o cuerpos fructíferos como los que se muestran a continuación y que permiten su identificación por medio de la morfología:

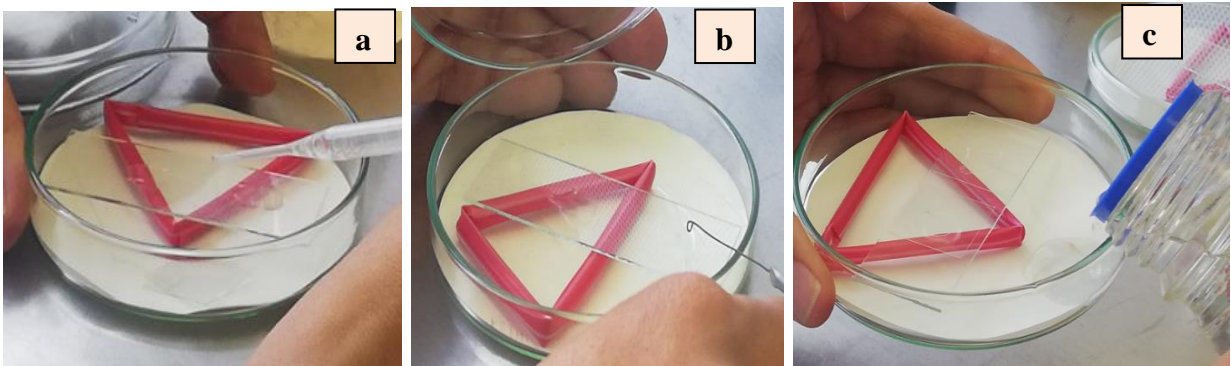


Estructuras presentes en hongos. Tomado de: <https://docplayer.es/76846033-Carpeta-de-mesa-area-microbiologia.html>

Actualmente se están realizando montajes de microcultivos con el fin de observar las estructuras completas de los hongos ya que no hay rompimiento del micelio o maltrato de estructuras como ocurre con el método de la impronta. Básicamente se trata de un montaje húmedo dentro de una caja de Petri, en la cual va una lámina con el medio de cultivo y la colonia en él, colonia a la que posteriormente se le adiciona el medio PVLG que lo conserva de forma permanente para su análisis y observación. La preparación del medio se encuentra detallada en el anexo 1 y la metodología de microcultivos en el Anexo 4.



Montaje para microcultivo de hongos. Autor, 2019.



a) Aplicación del medio- b) inoculación del hongo- c) adición de agua estéril. Autor, 2019.

b. Metodología para el análisis de bacterias

Selección del tejido: La selección de tejido se hace de forma similar que para hongos e igualmente se selecciona tejido con lesiones leves, para que no esté muy contaminado por otros microorganismos.

Desinfección de tejido: Se realiza en cabina de flujo laminar, previamente desinfectada y con mecheros prendidos. Tanto el tipo, como la concentración del desinfectante y el tiempo de contacto son determinados según lo indicado en el método. Generalmente se emplean soluciones de hipoclorito que luego son enjuagadas por triplicado con agua destilada estéril. Posteriormente se dejan secar muy bien junto al mechero y se maceran con agua destilada estéril, a esto se realizan diluciones, la metodología completa para realizar las diluciones se encuentra en el Anexo 5.

Siembra en agar Nutritivo: Se realiza en cabina de flujo laminar (con las mismas condiciones para la desinfección). Generalmente se usa agar nutritivo, pero también puede usar otros medios específicos según el tipo de patógeno a determinar. Se siembra cada dilución según procedimiento en una caja. Se tapa y se sella con papel parafilm.

Incubación: Las cajas con las diluciones son llevadas a incubación durante 48 horas a una temperatura de 27°C +/- 2. Se realiza revisión a diario para observar posible crecimiento de estos microorganismos.

Una vez se tiene desarrollo de la colonia bacteriana se procede a seleccionar las colonias con características morfológicas esperadas, exactamente como se realizó para hongos teniendo en cuenta características:

- Configuración o Forma

- Su borde
- Su perfil o elevación

Se para la colonia seleccionada y se hace el pase a agar. Luego se le aplica la tinción Gram (Ver anexo 6), oxidasa, pruebas bioquímicas y por último análisis moleculares para confirmación de la especie.

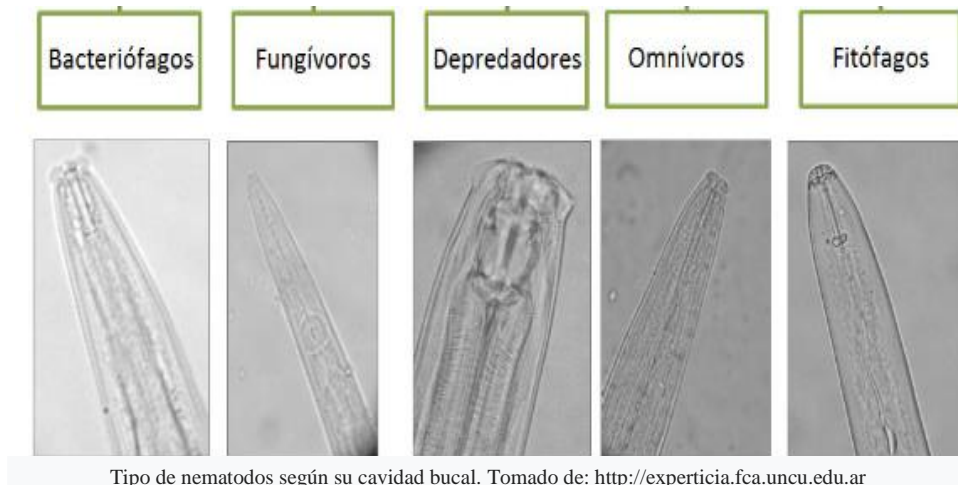
c. Metodología para el análisis de Nematodos

Llevar la caja o vidrio de reloj al estereoscopio con la muestra de agua previamente procesada en embudo o tamiz. Si la especie a determinar es de tamaño muy pequeño dentro de la escala observada, entonces con la ayuda de una micropipeta tomar la gota donde al parecer está el nematodo y llevar a una lámina para revisar en microscopio, o también se puede tomar la muestra en vidrio de reloj y llevar directamente a observación en el microscopio.

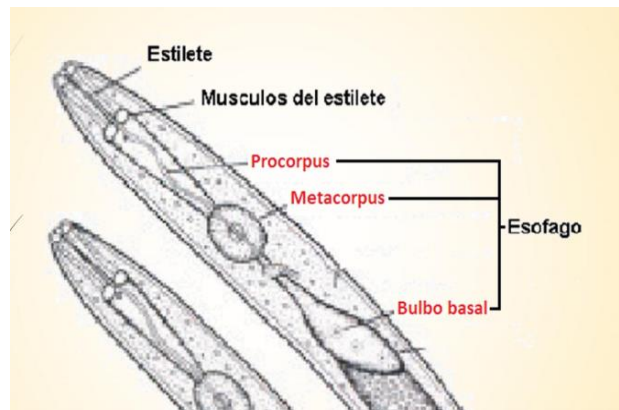


Agua extraída para revisión de nematodos al microscopio. Autor, 2019.

Una vez que se determina que existe un nematodo se procede a su clasificación por morfología, empezando porque posea un odontoestilete en su cavidad bucal, típico de los nematodos Fitoparásitos o Fitófagos.



La clasificación morfológica se basa en algunas de las siguientes partes:



Parte anterior de un nematodo. Tomado de: <http://agricultura.uson.mx>

En caso de encontrarse un nematodo con aparato bucal característico de un Fitopatógeno se procede a revisar otras características morfológicas, de acuerdo a descripciones

publicadas en documentos internacionales especializados en nematología, por ejemplo Shurtleff y Averre III, 1997.

d. Metodología para el análisis de Virus

Para el análisis de virus se emplean técnicas moleculares, las cuales comprenden las siguientes etapas:

- Extracción
- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
- Electroforesis

Extracción:

En el LCV la extracción es realizada por tres métodos. Cabe recordar que los virus pueden contener en su cápside ADN o ARN, nunca ambos por tanto en el laboratorio se manejan dos kits de extracción, uno para ADN y otro para ARN y un método tradicional con soluciones preparadas. - Ver metodología completa en Anexo 7:

- a. Qiagen DNeasy plant mini kit.
- b. Qiagen RNeasy mini kit
- c. O'Donell – CTAB

PCR:

Inicialmente extrajimos el ADN, ahora la idea es replicarlo mediante la metodología de PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para esto debemos adicionar todos los componentes que se necesitan descritos en el Anexo 1 sección “Soluciones reactivas para

Biología Molecular – PCR”, estos juntos en una mezcla se conocen como Master Mix, que es la base para adicionar el ADN y someterlo a la PCR. La mezcla se debe calcular ayudándonos de una tabla y cálculos que se describen el Anexo 8. Con la variante de que se emplean primers universales para virus y si se requieren algunos específicos según metodología encontrada. Además, para virus con ARN se debe realizar previamente una se tiene que retrotranscribir la hebra de ARN, en ADN complementario, mediante la utilización de una enzima llamada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Una vez transcrito en ADN complementario, se realiza PCR convencional.

Una vez tengamos el cálculo de los volúmenes a adicionar de cada componente los adicionaremos en el siguiente orden:

1. Agua
2. Buffer
3. Cloruro de Magnesio
4. dNTP's
5. Primers
6. Por último, la Taq Polimerasa, debe permanecer siempre en congelador a -20°C y no someterla al calor de la mano, se debe tener con hielo durante su adicción.

Una vez realiza la mix se adiciona el volumen final menos el volumen de ADN a cada tubo Eppendorf que contiene $3\ \mu\text{l}$ de ADN a replicar. No se debe olvidar usar un control negativo, un positivo y un blanco (en lugar de ADN lleva agua tipo molecular). Esta mezcla final con ADN y los controles son llevados a tubos para PCR y sometida al termociclador, este puede que ya tenga el programa con los ciclos a someter la muestra, si no se debe revisar el manual de operación e ingresar el ciclo a trabajar. La PCR pasa por las siguientes fases en un ciclo: desnaturalización, hibridación y elongación. Las condiciones de temperatura y tiempo para cada fase dependen de las regiones génicas a amplificar.

Desnaturalización: Separación de las hebras de ADN que ocurre a los 95°C

Hibridación: Los primers se unen a la hebra separada, ocurre entre los 35-60°C

Elongación: La Taq Polimerasa incorpora los nucleótidos (dNTP's) complementarios a la hebra, esto ocurre a los 72°C

NOTA: El ciclo se debe repetir entre 25 y 35 veces para obtener varias réplicas. Después de esto el termociclador baja su temperatura a 4°C, pero se recomienda programarlo para que baje solo hasta 10°C, con esto no se esfuerza mucho el equipo y se prolonga la vida útil del mismo.

Electroforesis

Una vez finalizada la PCR; las muestras son sembradas en gel de agarosa, la metodología para la preparación de este gel se encuentra detallada en el Anexo 1. Una vez ya esté preparado el gel procedemos de la siguiente manera:

Colocar sobre la cámara de electroforesis el gel y rellenar con TBE 1X hasta cubrir el gel y los electrodos por completo.

En el primer pozo sembrar el marcador de peso molecular (es una referencia de los diferentes tamaños de los fragmentos de ADN, lo que permite medirlos). Luego en los demás sembrar 3µl de buffer carga (da peso a la muestra para que quede en el pocillo y tiene colorantes que avisan cuando detener la electroforesis) mezclados previamente con 5µl de muestra. Cada muestra se debe manejar por separado y debe ir cada una en un pozo diferente.

Tener cuidado de conectar los electrodos de forma adecuada, generalmente el cable negro es de carga negativa y el cable rojo de carga positiva. El ADN presenta carga negativa por tanto correrá buscando la carga positiva.

Un indicativo de que la cámara está funcionando es que se observan minúsculas burbujas que suben desde la resistencia hasta la superficie de la cámara a lado y lado de la misma. Igualmente se puede ver una separación de colores amarillo y azul que empiezan a correr en el gel, se para la electroforesis antes de que se observe que el colorante revelado por buffer carga llegue al borde del gel.

Una vez esté listo se lleva el gel al equipo transiluminador, este usa luz UV para evidenciar las bandas fluorescentes, ya que al adicionar SYBR safe (colorante de cianina) al gel de agarosa, este se une al ADN formando un complejo que absorbe luz azul de 509 nm y emite luz verde de 524 nm, lo que hace que se vea fluorescente ante la luz UV, permitiendo ver las bandas de corrido del ADN a través del gel.

IMPLEMENTACIÓN DE REQUISITOS DE LA NORMA ISO/IEC 17025 Y SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN EL LABORATORIO

Durante todo el proceso en el LCV se trata de cumplir al máximo posible y dentro de sus posibilidades con los requisitos de la norma ISO/IEC 17025, es de resaltar que se encuentra aún en proceso de transición entre la norma de BPL y ISO/IEC 17025. Para cumplir con la norma ISO/IEC 17025 se apoyaron las siguientes actividades:

a. Revisión y divulgación de los siguientes documentos:

- Asistencia a capacitación sobre certificados de caracterización e interpretación del Laboratorio de soporte interno en metrología.
- Plan de Gestión Integral de desechos Peligrosos
- Instructivo Manejo de documentos y registros en los laboratorios
- Procedimiento control de trabajo no conforme (TNC).
- Procedimiento confidencialidad, imparcialidad, independencia e integridad en los laboratorios.

- Procedimiento gestión del personal en los laboratorios

b. Elaboración de las fichas de operación de los siguientes equipos:

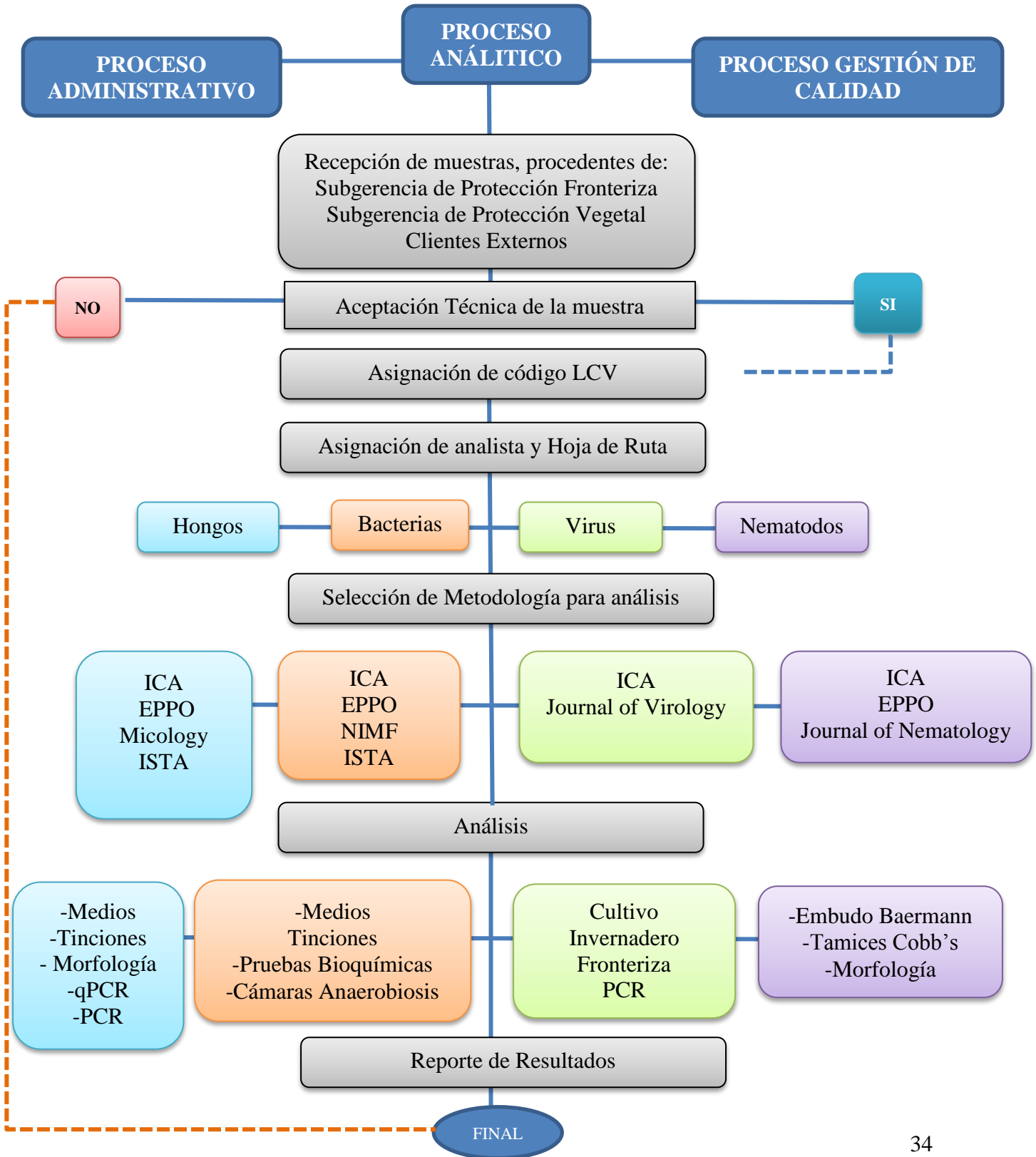
- Autoclave
- pHmetro
- Termociclador

Para la elaboración de las mismas fue necesario la revisión de los manuales de los equipos antes mencionados, de estos se extrajo información sobre su instalación, uso, medidas de seguridad. Además, se hizo revisión de las actividades aplicables que debe realizar cada funcionario del laboratorio en relación a cada equipo; entre estas actividades de limpieza, de uso, de control, verificación, calibración y/o reporte de novedades. Toda la información obtenida se llevó registro en la forma para instructivos de operación. La cual contiene algunos ítems como: Objetivo del instructivo, generalidades, descripción de tareas, Formas o formatos aplicables o relacionados con el equipo, anexos, referencias y registro fotográfico de las partes del equipo.

c. Elaboración de las formas para el diligenciamiento de datos internos

- Adecuación de la forma “Envasado y esterilización del agua” y evaluación de mesófilos para determinar la pertinencia de este análisis como control al agua por los problemas generados con la calidad de la misma en los análisis del laboratorio

El anterior proceso se repite continuamente y es resumido en el siguiente diagrama.



RESULTADOS

Todo el personal del laboratorio debe recibir instrucciones con respecto al Procedimiento de confidencialidad, imparcialidad, independencia e integridad en los laboratorios; este recalca que tanto las muestras, como la información que de ellas se obtenga son de propiedad exclusiva del cliente, incluidos los resultados. Adicional a esto Todo el personal debe firmar un compromiso de confidencialidad que da fe de su buen manejo con la información (Ver anexo 9). Por tanto, no es posible divulgar toda la información a la cual se tuvo acceso, incluidos algunos de los resultados. También cabe resaltar que el apoyo se dio más en el análisis de hongos y nematodos, para el análisis de bacterias y virus el apoyo fue de forma parcial.

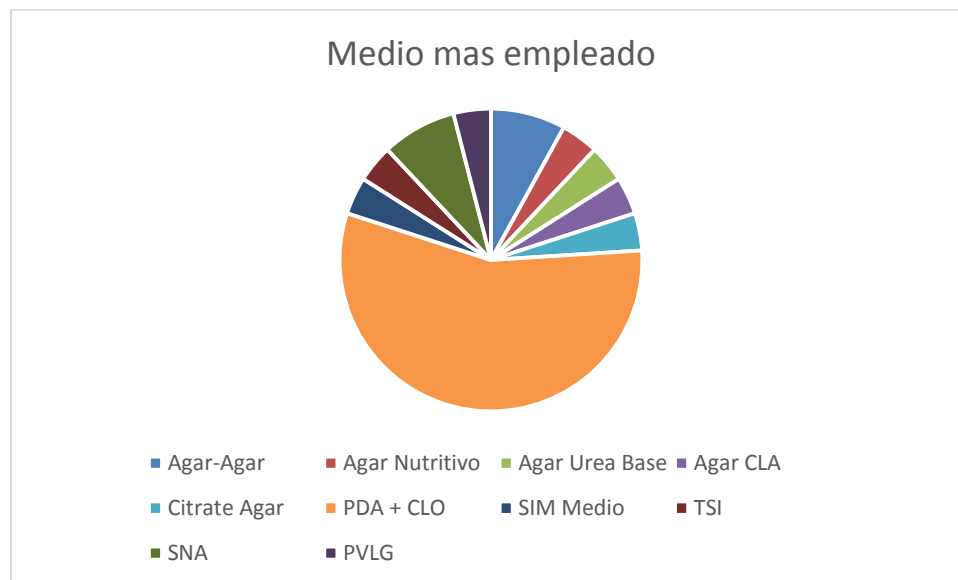
FASE PREANALÍTICA

El laboratorio de cuarentena ha recibido en los últimos tres meses 84 muestras, que fueron ingresadas y generada su hoja de ruta (hoja de trabajo).

Durante la pasantía en el LCV se prepararon los siguientes medios:

| Medio o solución | Uso | N°. preparaciones |
|------------------|---|-------------------|
| Agar-Agar | Crecimiento general de bacterias | 2 |
| Agar Nutritivo | Mesófilos control agua estéril | 1 |
| Agar Urea Base | Pruebas bioquímicas bacterias. Identifica bacterias que hidrolizan urea. | 1 |
| Agar CLA | Hongos que forman ascosporas, esporoquios y macroconidias. Esporulación de <i>Fusarium</i> de 6-10 días. | 1 |
| Citrate Agar | Pruebas bioquímicas bacterias. Identifica bacterias que emplean el fosfato de amonio dihidrogenado y citrato sódico como fuente de energía. | 1 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| PDA + CLO | Para hongos en general, presenta cloranfenicol que es un antibiótico con lo cual se evita el desarrollo de bacterias. | 14 |
| SIM Medio | Pruebas bioquímicas bacterias. Para diferenciar bacterias entéricas producen sulfuro de hidrógeno, indol y que presentan motilidad (movimiento). | 1 |
| TSI | Pruebas bioquímicas bacterias. Para determinar enterobacterias que fermenten o no glucosa, sacarosa, que produzcan ácido sulfhídrico, con gas o sin él. | 1 |
| SNA | Hongos como <i>Fusarium</i> y <i>Cilindrocarpon</i> . Ayuda a la formación de macro y microconidias y clamidiosporas son más visibles. | 2 |
| PLVG | Montaje permanente de microcultivos | 1 |
| TOTAL | | 25 |





Recepción de muestras. Fuente: Autor, 2019



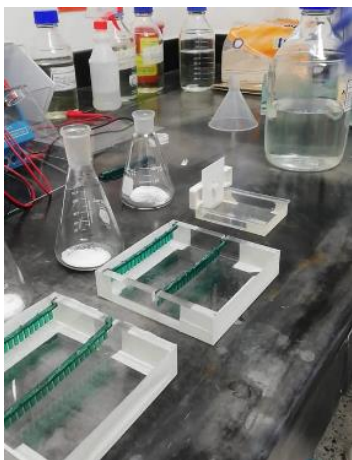
Procesamiento de muestras para análisis de virus (extracción de nervadura central). Fuente: Autor, 2019



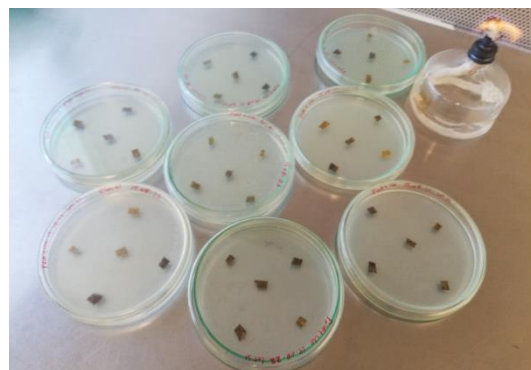
Procesamiento de muestras de suelo y raíces, para análisis de nematodos. Fuente: Autor, 2019



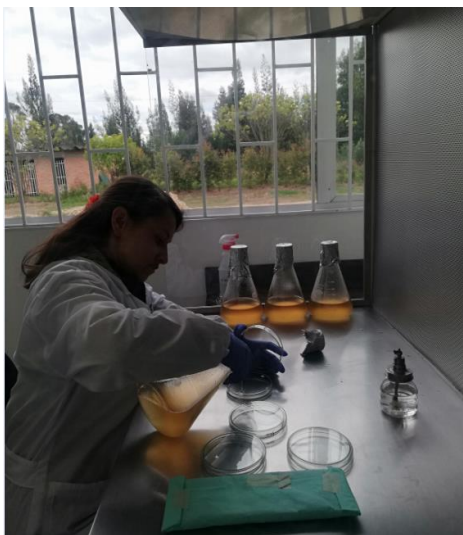
Procesamiento de muestras para análisis del Oomycete *Plasmopara halstedii*. Fuente: Autor, 2019



Preparación de geles de agarosa.
Fuente: Autor, 2019



Medio CLA. Fuente: Autor, 2019



Apoyo a la preparación de medios. Fuente: Autor, 2019



Montaje De cajas para microcultivos de hongos. Fuente:
Autor, 2019



Procesamiento de muestras foliares, para análisis de
nematodos. Fuente: Autor, 2019

FASE ANALÍTICA

En esta fase es importante aclarar que ningún personal puede realizar la fase analítica sin antes haber pasado por una inducción o entrenamiento, una verificación (evaluación teórica validada por su práctica y una respectiva autorización por escrito por parte del coordinador de laboratorios. Por tanto el apoyo a muchos de los análisis se realizó de manera parcial y se logró llegar a verificación de las siguientes actividades:

- Preparación de geles de agarosa y montaje para electroforesis
- Preparación de medios para pruebas bioquímicas
- Preparación de la master mix para montaje en PCR

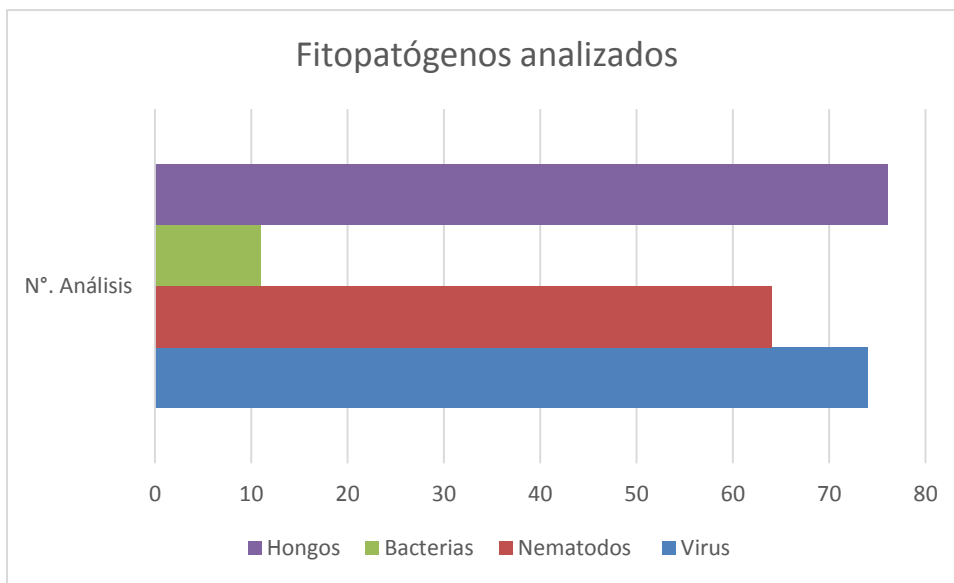
Dentro de los análisis solicitados al laboratorio durante la pasantía se encontraron los siguientes clasificados según el tipo de microorganismo:

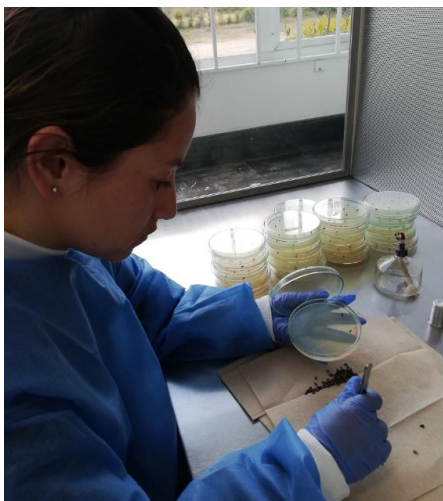
| Hongos u Oomycete Fitopatógenos | Hospedante | N°. análisis | Bacterias Fitopatógenas | Hospedante | N°. análisis |
|---|------------|--------------|---------------------------|------------|--------------|
| <i>Phytophthora fragariae</i> (Oomycete) | Fresa | 3 | <i>Erwinia amylovora</i> | Fresa | 2 |
| <i>Cylindrocarpon spp</i> | Fresa | 3 | <i>Xylella fastidiosa</i> | Café | 9 |
| <i>F. oxysporum f. sp. Fragariae</i> | Fresa | 3 | | | |
| <i>Plasmopara halstedii</i> (Oomycete) | Girasol | 4 | | | |

| | | | |
|------------------------------------|-----------|----|-----------|
| <i>Alternaria zinniae</i> | Girasol | 4 | |
| <i>Sclerotium coffeicola</i> | Café | 1 | |
| <i>F. oxysporum f. cubense RT4</i> | Banano | 28 | |
| <i>Fusarium circinatum</i> | Pino | 1 | |
| <i>Botrytis tulipae</i> | Lirio | 29 | |
| TOTAL | 76 | | 11 |

| Nematodos Fitopatógenos | Hospedante | N°. análisis | Virus Fitopatógenos | Hospedante | N°. análisis |
|-----------------------------------|------------|--------------|----------------------------------|------------|--------------|
| <i>Aphelenchoides ritzemabosi</i> | Fresa | 6 | <i>Strawberry crinkle virus</i> | Fresa | 6 |
| <i>Pratylenchus crenatus</i> | Lirio | 29 | <i>Strawberry latent C virus</i> | Fresa | 3 |
| <i>Pratylenchus pratensis</i> | Lirio | 29 | <i>Black raspberry virus</i> | Frambuesa | 2 |
| | | | <i>Arabis mosaic virus</i> | Frambuesa | 2 |
| | | | <i>Tomato black ring virus</i> | Frambuesa | 2 |

| | | | | |
|--------------|-----------|-------------------------------|-----------|----|
| | | <i>Sunflower mosaic virus</i> | Girasol | 1 |
| | | <i>Lili virus X</i> | Lirio | 29 |
| | | <i>TRV virus</i> | Lirio | 29 |
| TOTAL | 64 | | 74 | |

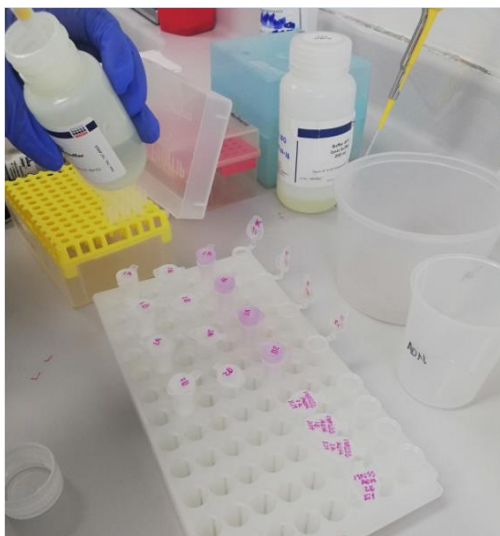




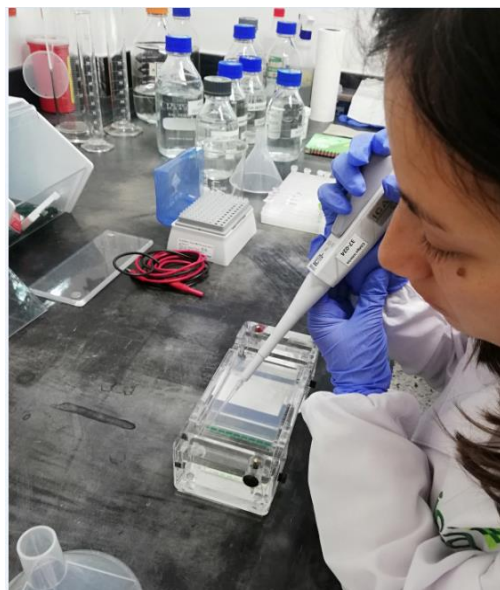
Siembra de semillas para análisis de hongos.
Fuente: Autor, 2019



Toma de micelio para extracción de ADN. Fuente: Autor, 2019



Extracción de ácidos nucleicos. Fuente: Autor, 2019



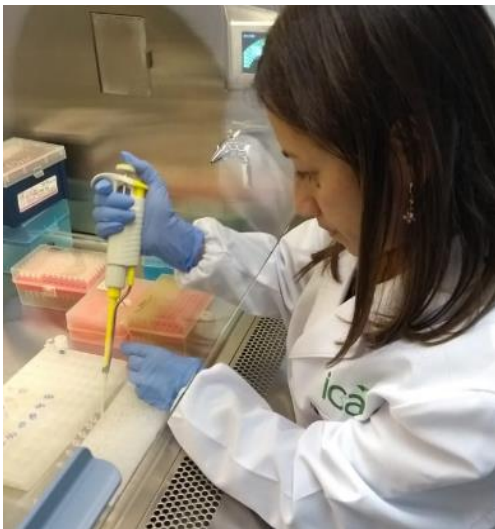
Siembra en gel de agarosa para evaluar la extracción de ADN.
Fuente: Autor, 2019



Montaje de microcultivos. Fuente: Autor, 2019



Programa Seleccionado para la PCR en hongos, se muestran los tiempos y temperaturas de cada ciclo. Fuente: Autor, 2019



Preparación de la mix para PCR Fuente: Autor, 2019

IMPLEMENTACIÓN DE REQUISITOS DE LA NORMA ISO/IEC 17025 Y SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN EL LABORATORIO

ICA Instituto Colombiano Agropecuario SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD

PROCESO DE APOYO
SUBPROCESO: CÓDIGO:
INSTRUCTIVO OPERACIÓN POTENCIÓMETRO CORNING

OBJETIVO
Describir el procedimiento para la limpieza, control y uso del equipo Potenciómetro Corning

1. GENERALIDADES

- El potenciómetro permite determinar el potencial de iones hidronio H⁺, medidos en una escala que va de 0 a 14, donde valores por debajo de 6 tienden a medio ácidos, 7 es neutro y por encima de 8 son declarados básicos.

0 Ácidos 7 Neutro 8 Básicos 14

- Es necesario realizar un seguimiento del correcto funcionamiento del Potenciómetro con lo cual se contribuye a la validez de los resultados generados por el Laboratorio. Por tal motivo se debe:
 - Realizar entrenamiento al personal del laboratorio antes de operar o usar el Potenciómetro, el responsable del laboratorio o la persona asignada para tal fin debe asegurarse que cada persona en el laboratorio esté entrenada adecuadamente.
 - Todo el entrenamiento debe ser documentado y los registros conservados en el laboratorio.
- Se debe evaluar los rangos de trabajo usados frecuentemente en el laboratorio para así mismo calibrar y verificar el equipo adecuándolo al rango de trabajo. Para el caso del Laboratorio de Cuarentena Vegetal las mediciones se realizan entre valores de pH de 6 y 8, por tanto la calibración y verificación se debe realizar con dos soluciones buffer (de pH 7 y 10).

Buffer 7 (mide de 6-8) Buffer 10 (mide de 9-11)

0 Ácidos 7 Neutro 8 Básicos 14

- Se debe tener especial cuidado con el electrodo. Después de tiempos prolongados sin uso este debe permanecer sumergido en una solución electrolítica de KCl 3M. Si su uso es constante se puede sumergir en agua destilada y al final de cada jornada sumergirlo en KCl 3M.
- Durante la medición es importante tener en cuenta la temperatura de la muestra, ya que el equipo presenta un integral de compensación de temperatura automático, por tanto lo ideal es que las calibraciones, verificaciones y mediciones se realicen a una temperatura de 20°C. El equipo se puede ajustar a las condiciones de trabajo con temperaturas diferentes a 20°C, para este caso se debe observar la escala de temperatura y el rango de pH que se observa en el frasco de solución buffer y ajustar el equipo a la temperatura de trabajo.
- Las soluciones a emplear en verificación y/o calibración no se deben usar después de la fecha de expiración.
- Cuando se sospeche de contaminación del electrodo por proteínas, este se debe sumergir durante 30 min en una solución de pepsina al 10%. Si la contaminación es por aceites o grasas, sumergir en una solución de agua y cetona al 50%. Enjuagar con agua desionizada.

ICA Instituto Colombiano Agropecuario SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD

PROCESO DE APOYO
SUBPROCESO: CÓDIGO:
INSTRUCTIVO OPERACIÓN POTENCIÓMETRO CORNING

| | | | |
|---|-------------------------|--|--|
| 4 | Analista de laboratorio | Realizar la verificación del funcionamiento del equipo mediante el uso de soluciones buffer de pH 7 y 10. | Equipo verificado apto para iniciar lecturas |
| 5 | Analista de laboratorio | Realizar la calibración del equipo mediante el uso de soluciones buffer de pH 7 y 10. Esta se realizará cuando la verificación se salga de rango o si no es entregado calibrado después de un mantenimiento. | Equipo calibrado |

3. FORMAS

- Forma 3-764 versión 01.2014 "Uso de equipos de laboratorio"
- Forma 3-134 versión 02.2016 "Limpieza y desinfección de áreas y equipos"
- Forma 3-747 versión 01.2014 "Bitácora de Uso de equipos en los laboratorios"

PARTE FRONTAL



ELECTRODO



Instructivo de Potenciometro. Fuente: Autor, 2019

ICA Instituto Colombiano Agropecuario SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD

PROCESO DE APOYO
SUBPROCESO: CÓDIGO:
INSTRUCTIVO OPERACIÓN TERMOCLADOR PCR CONVENCIONAL

OBJETIVO
Describir el procedimiento para la limpieza, control y uso del equipo Termociclador para PCR Convencional PTC-100

1. GENERALIDADES

- El termociclador es un equipo que permite realizar ciclos de temperatura rápidos y continuos para la reacción en Cadena de la Polimerasa (Método para amplificar fragmentos de ADN). Esto se realiza mediante un bloque con resistencia eléctrica que distribuye temperatura de forma uniforme, generalmente se usan temperaturas entre los 4-90°C, pero el rango del equipo está entre los 0 y 100°C.
- Es necesario realizar un seguimiento del correcto funcionamiento del Termociclador, con lo cual se contribuye a la validez de los resultados generados por el Laboratorio. Por tal motivo se debe:
 - Realizar entrenamiento al personal del laboratorio antes de operar o usar el Termociclador, el responsable del laboratorio o la persona asignada para tal fin debe asegurarse que cada persona en el laboratorio esté entrenada adecuadamente.
 - Todo el entrenamiento debe ser documentado y los registros conservados en el laboratorio.
 - Debe estar operando a una temperatura ambiente entre los 4-32°C y una humedad de 10-90%, en caso contrario se deben ajustar.

2. DESCRIPCIÓN DE TAREAS

- Conectar el equipo a una Fuente de corriente eléctrica con polo a tierra y conexión de 100-240V.
- Nunca olvide los elementos de protección personal: guantes de látex o nitrilo, bata de laboratorio, calzado cerrado.
- Prender el termociclador del botón ubicado en la parte trasera del equipo.
- Verifique el buen estado de sellamiento de la tapa, para esto soltar la perilla de la tapa suavemente hasta el tope y presionar el botón de apertura.
- Chequee el bloque y los pocillos, no deben tener en su interior ningún elemento dejado en el último uso, igualmente no debe existir ningún material adherido a ellos, de ser así realice las actividades descritas en el punto N° 2 del cuadro de tareas. **NUNCA** emplee soluciones alcalinas para la limpieza del equipo, esto incluye jabones alcalinos e hipoclorito de sodio.
- Revise que el bloque cuente con los cuatro (4) tubos plásticos de soporte, estos nivelan la tapa, lo cual ayuda a que la temperatura se distribuya de forma uniforme.
- Asegúrese de que la muestra esté bien homogeneizada antes de proceder a introducir los tubos en los pocillos.
- Coloque los tubos con la muestra a amplificar. Procure tener la carga completa (el equipo cuenta con noventa y seis (96) pocillos para muestra), en caso contrario deje los 4 tubos plásticos de soporte en cada esquina del bloque y distribuya muy bien los demás tubos de muestra.
- Cierre adecuadamente el termociclador bajando suavemente la tapa y apretando la perilla de forma suave hasta el tope.
- Programa el equipo para realizar los ciclos que de forma general se dan de la siguiente forma:

| Ciclo | Rango de Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Componente que actúa |
|------------------------|---------------------------|--------------|----------------------|
| Desnaturalización | 94-96 | 4-5 | Temperatura |
| Hibridación | 50-65 | | Primeras |
| Extensión o Elongación | 72 | | Tag Polimerasa |

ICA Instituto Colombiano Agropecuario SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD

PROCESO DE APOYO
SUBPROCESO: CÓDIGO:
INSTRUCTIVO OPERACIÓN TERMOCLADOR PCR CONVENCIONAL

PARTE FRONTAL



PARTE SUPERIOR INTERNA






TABLERO DE CONTROL



A. Luz de encendido
B. Gráfico de barras LED: Indica con color rojo cuando el equipo está calentando y con color verde cuando está enfriando.
C. Pantalla LCD
D. Teclado numérico
E. Teclas de operación
F. Selección derecha: Mueve el cursor un espacio o una opción a la derecha
G. Selección izquierda: Mueve el cursor un espacio o una opción a la izquierda
H. Proceder: Acepta una opción de menú o pantalla seleccionada.
I. Stop: Finaliza un protocolo en ejecución.
J. Pausa: Detiene un protocolo durante la ejecución.
K. Incubación instantánea: Inicia un programa de incubación simple que establece el equipo.

Instructivo de operación del Termociclador de PCR convencional. Fuente: Autor, 2019

| | | | | | | | | | |
|--|-------------|---------|---|--|--|-------------|---------|---|--|
| <p style="text-align: center;">ICA Instituto Colombiano Agropecuario</p> <p style="text-align: center;">SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD</p> <p style="text-align: center;">PROCESO DE APOYO</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">SUBPROCESO:</td> <td style="width: 50%;">CÓDIGO:</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">INSTRUCTIVO OPERACIÓN AUTOCLAVE MICROCONTROL (EQUITEOROS)</td> </tr> </table> | SUBPROCESO: | CÓDIGO: | INSTRUCTIVO OPERACIÓN AUTOCLAVE MICROCONTROL (EQUITEOROS) | | <p style="text-align: center;">ICA Instituto Colombiano Agropecuario</p> <p style="text-align: center;">SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD</p> <p style="text-align: center;">PROCESO DE APOYO</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">SUBPROCESO:</td> <td style="width: 50%;">CÓDIGO:</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">INSTRUCTIVO OPERACIÓN AUTOCLAVE MICROCONTROL (EQUITEOROS)</td> </tr> </table> | SUBPROCESO: | CÓDIGO: | INSTRUCTIVO OPERACIÓN AUTOCLAVE MICROCONTROL (EQUITEOROS) | |
| SUBPROCESO: | CÓDIGO: | | | | | | | | |
| INSTRUCTIVO OPERACIÓN AUTOCLAVE MICROCONTROL (EQUITEOROS) | | | | | | | | | |
| SUBPROCESO: | CÓDIGO: | | | | | | | | |
| INSTRUCTIVO OPERACIÓN AUTOCLAVE MICROCONTROL (EQUITEOROS) | | | | | | | | | |

| | |
|---|--|
| <p>OBJETIVO Describir el procedimiento para la limpieza, control y uso de la autoclave Miccontrol (Equiteoros)</p> <p>1. GENERALIDADES</p> <ul style="list-style-type: none"> • La autoclave es el equipo que se utiliza para esterilizar, es decir, la destrucción o eliminación de microorganismos. • Es necesario realizar un seguimiento del correcto funcionamiento de autoclaves por tal motivo se debe: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Realizar entrenamiento al personal del laboratorio antes de operar o usar la autoclave, el responsable del laboratorio o la persona asignada para tal fin debe asegurarse que cada persona en el laboratorio esté entrenada adecuadamente. ◦ Todo el entrenamiento debe ser documentado y los registros conservados en el laboratorio. ◦ Llevar el registro del uso de la autoclave. • Cuando esterilice frascos con tapa rosca, NO ajustar por completo la tapa, ya que podrían romperse debido a la presión ejercida por la autoclave. • Sin importar la necesidad, nunca abra la puerta antes de que la presión llegue a cero. • Colocar cinta indicadora o testigo como indicador químico, así mismo, revisar que el control de esterilidad mensual se haya realizado (Forma 3-306 "Control biológico de autoclaves"). • Si se esteriliza material sólido, una vez terminado el proceso de esterilización, puede abrirse la puerta solo cuando la presión llegue a cero (0) PSI. • Parte importante del proceso de esterilización es que el vapor se produzca a partir de agua limpia. Por lo tanto, se aconseja el uso de agua destilada. <p>2. DESCRIPCIÓN DE TAREAS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Conectar el equipo a una fuente de corriente eléctrica trifásica, con polo a tierra y conexión a 220v. • Prender la autoclave. • Chequee dentro de la cámara que no haya ningún elemento dejado en el último uso. • Verifique el buen estado de sellamiento de la tapa o puerta de cierre. • Revisar el nivel y limpieza de agua y llénela con agua destilada hasta el nivel indicado en el equipo (8 L aprox.) • Coloque el material o soluciones a esterilizar. Procure tener la carga completa. • Cierre adecuadamente la autoclave comprobando que todas las bayonetas estén en su sitio, nos ayudamos del volante para hacer que estén lleguen contra el tope de la puerta. • Programe la temperatura 121°C, la presión 15 PSI y el tiempo de 45 minutos. Recuerde que La autoclave empieza a contabilizar el tiempo programado solo hasta que alcanza la temperatura programada, antes NO. • Espere a que el tiempo de esterilización finalice. • Para el descargue y apertura de la autoclave utilice los elementos de protección personal: guantes resistentes al calor, bata de laboratorio, protección para los ojos, calzado cerrado; mantenga una distancia prudente, por su seguridad y del material que se encuentra dentro. | <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>PARTE FRONTAL EXTERNA</p>  <p>Volante Bayoneta Tablero de control</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>TABLERO DE CONTROL</p>  </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <p>PARTE FRONTAL INTERNA</p>  <p>Cámara de esterilización.</p> </div> <p>A. Botón de encendido (energiza el tablero de control)</p> <p>B. Manómetro para control de presión (PSI)</p> <p>C. Controlador de Temperatura digital (0-200°C)</p> <p>D. Reloj de ciclo (1-60 minutos)</p> <p>E. Indicador de Inicio de ciclo</p> <p>F. Indicador de fin de ciclo</p> |
|---|--|

Instructivo de Autoclave. Fuente: Autor, 2019

Como parte del apoyo a la implementación de la norma ISO 17025 se realizó también un seguimiento a la calidad del agua esterilizada. Para esto se realizaron siembras del agua en agar nutritivo y se incubaron a 35°C durante 48 horas para determinación de mesófilos. Estos dieron como resultado 0 UFC/100 mL de agua. Luego de esto se procedió a la creación e implementación del siguiente formato con el fin de empezar a ser un seguimiento y loteo al agua esterilizada.

FASE ANALÍTICA

Se pudo determinar que de las muestras ingresadas por comercio exterior ninguna arrojó resultado detectable, con lo cual cumple con la resolución emitida por el ICA en cuanto a que estas especies se encuentran catalogadas como plagas cuarentenarias ausentes según la norma aplicable la Resolución 3593 de 2015 (ICA, 2015) .

Para el caso de las muestras nacionales algunas arrojaron resultados positivos como es de conocimiento público divulgado por el ICA en medios de comunicación, pero no es posible divulgar en este trabajo que zonas arrojaron resultados positivos o que zonas se encuentran bajo control. Es competencia de las directivas del ICA y el Ministerio de Agricultura establecer o modificar la resolución 3593 de 2015 para cambiar el estatus de la plaga *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Raza 4 Tropical (FocR4T) de plaga cuarentenaria ausente a presente.

Como análisis podemos decir que de las 84 muestras ingresadas el 67% pertenecían a material de importación provenientes de La Subdirección de Protección Fronteriza originaria de los siguientes países:

Chile:

9 muestras de Fresa (estolones (6) y tejido foliar (3). De las Variedades Abilón (5), Camino Real (2) y Monterrey (2)

29 muestras de Lirio (Bulbos)

Estados Unidos:

2 muestras de Frambuesa (tejido foliar). De las variedades Pacific Centennial (1) y Julieta (1)

Francia:

5 muestras de Girasol (semillas (4), tejido foliar (1). De las variedades Shakira, Bella y Veronika

México:

9 muestras de café (Tejido foliar (5), raíces con suelo (4). Plántulas de banano (1) de las que no informaron la variedad.

República de Sudáfrica:

1 Muestra de semillas de pino de la cual no se informó variedad.

El restante de muestras recibidas en el LCV (28) procedían de la Subdirección de Protección Vegetal, todas de origen colombiano, en su mayoría (27) enviadas para el análisis del Fitopatógeno *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Raza 4 Tropical (FocR4T), que en campo mostraron sintomatología vascular, por lo que fueron enviadas muestras de fragmentos de pseudotallo y cormo para su análisis. Con la siguiente procedencia:

Guajira:

22 Muestras de estas 21 fueron de Banano de las variedades filo (4), Filo enano (1), Manzano (1), Valery (9), Williams (6). Y 1 de Plátano de la variedad Hartón (1).

Magdalena:

5 muestras de estas todas fueron de Banano de las variedades Valery (4) y Cavendish (1)

Nariño:

1 muestra de tejido foliar de Limón variedad Tahití para análisis de *Xylella fastidiosa*.

Por tanto podemos analizar que el 33% del material recibido era proveniente de cultivos nacionales. Esto se explica por la emergencia nacional ocurrida con el Fitopatógeno *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Raza 4 Tropical (FocR4T). El restante de muestras tuvo procedencia de otros países como Chile que fue del que más se recibió material vegetal, seguido de México. También se puede evidenciar que el material vegetal que más ingreso corresponde a bulbos de Lirio (29) seguido por fragmentos de pseudotallo y calcetas (26), seguidas de tejido foliar (11) muestras.

Con el apoyo en actualización, elaboración y divulgación de documentos se pretende elevar los indicadores del programa de gestión de calidad del LCV, esto se evaluará al finalizar la pasantía, por lo tanto, aún no hay resultados totalmente definidos ya que se sigue trabajando en ello.

En cuanto a los seguimientos a agua potable se pudo analizar que el agua esterilizada cumple con los límites máximos en materia de Mesófilos ya que la norma aplicable la Resolución 2115 de 2007 (minambiente, 2007), en su artículo 11 párrafo 1 establece que los límites máximos para mesófilos en agua potable es de 100 UFC EN 100 cm³, por tanto el agua esterilizada al presentar 0 UFC EN 100 cm³ se encuentra cumpliendo con la norma, valor que era esperado debido a que se produce no como agua potable si no como agua estéril, por tanto no debía arrojar ninguna UFC.

CONCLUSIONES

- Se aprendió la importancia del diligenciamiento y manejo adecuado de datos asociados a las muestras y de su ingreso en una matriz que permite llevar un control de las mismas.
- Se generaron hojas de ruta correspondientes lo que permitió llevar una cadena de custodia de las muestras durante cada fase de los procesos de análisis.
- Se conocieron las metodologías adecuadas en la fase de preanalítica desde la preparación de medios de cultivo para hongos y bacterias (bioquímicas), además de soluciones y agares para electroforesis.
- Se llevaron a cabo las fases de preanalítica facilitando el análisis de **84 muestras** y la preparación de **25 medios de cultivo**.
- Se conocieron y aplicaron metodologías de análisis para nematodos mediante la realización de montajes para su extracción a partir de material vegetal, de suelo y raíces. Mediante las técnicas de embudo Baermann y tamices Cobb's. Lo permitirá diferenciar en campo los posibles géneros que pueden estar atacando a determinado cultivo.
- Se aplicaron metodologías en la ejecución de los procesos de análisis de hongos mediante pruebas microscópicas y moleculares.
- Se aplicaron metodologías para el análisis de Oomycetes, encontrando que estos géneros algunas veces necesitan de medios o pruebas especiales para su determinación, por tanto se debe tener especial cuidado en su determinación.
- Se desarrollaron las actividades de análisis de patógenos exóticos, en materia de hongos y nematodos, con una **participación del 62%** de análisis reportados. Con lo cual se logró reducir el envío de muestras al laboratorio LNDF y se cumplió con tiempos de respuesta.
- Se asistieron las acciones encaminadas a la implementación de requisitos de la norma ISO/IEC 17025 y sistemas de gestión de calidad en el laboratorio mediante la realización de divulgaciones de algunos procedimientos al personal del laboratorio., elaboración de instructivos de operación de equipos críticos.

- Como parte de seguimiento al sistema de gestión de calidad en materia de agua, se realizaron seguimientos al agua esterilizada empleada en los procesos, concluyendo que no era necesario realizar un seguimiento mediante mesófilos, debido a que durante el seguimiento no se reportaron colonias de microorganismos presentes en esta.
- Se participó de acciones de implementación con lo cual se logró **aumentar el indicador** general de **calidad** en un **18%**.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un procedimiento en el cual se indiquen los parámetros de aceptación, rechazo y manejo adecuado que se debe dar a cada tipo de muestra según patógeno a identificar, el tipo de material vegetal, cantidad recibida, estado fenológico, entre otros.
- Igualmente se recomienda hacer uso de un programa para el manejo de bases de datos como por ejemplo Microsoft® Access, lo que permite una interfaz amigable con el usuario, además de que permite la creación automática de hojas de ruta evitando ingresar información de forma duplicada, evita errores en el ingreso de la información y agiliza este proceso. También permite el ingreso de datos de la muestra sin que determinado usuario tenga acceso a toda la información lo cual favorece la confidencialidad en el manejo de la información.
- Adicionalmente se recomienda registrar la preparación de geles de agarosa. De la misma forma como se lleva el registro de preparación de medios, ya que de estos no solo se registra su pesaje, sino que además se lleva un control de la preparación en la forma 3-307 V2.2017. Lo que permite llevar un control más acorde. Tanto del insumo como de la actividad.
- Se recomienda la creación de un documento donde se registren todos los análisis realizados, en el cual se llegue a un consenso por parte de los analistas en cuanto a su realización, esto debido a que cada analista maneja metodologías diferentes a veces para el mismo patógeno, lo cual es bueno que este como tal estandarizado.
- Se recomienda manejar un código de colores para el almacenamiento seguro de reactivos, soluciones y medios de cultivo empleados. Esto haría más fácil encontrar los mismos en los estantes de almacenamiento. Además que es uno de los puntos claves que se evalúa en un sistema de calidad para los laboratorios.

BIBLIOGRAFÍA

- Aristizábal , N., & Torres, C. (17 de diciembre de 2015). Caracterización morfológica y molecular de Phytophthora en ají(Capsicum frutescens var. Tabasco), Valle del Cauca. Cali, Colombia: Universidad del Valle.
- Agrios, G. (2005). Fitopatología. México: Limusa.
- Arauz, C. (1998). Fitopatología, un enfoque agroecológico. . Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Díaz, R. J. (2017). Las enfermedades de las plantas: Impactos, amenazas y control. *Boletín de la Real Academia de Córdoba*, 111-130.
- Fabrega, A., Agut, M., & Calvo, M. (2002). EL GENERO ALTERNARIA: CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS Y CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS. *Anales de la Real Academia de Doctores*, 357-367.
- ICA. (09 de octubre de 2015). Resolución por medio del cual se crea el mecanismo para establecer, mantener, actualizar y divulgar el listado de plagas reglamentadas en Colombia. Colombia: Instituto Colombiano Agropecuario .
- Luna , I., Olave, A., Lopez, E., Cardona, W., & Alzate, J. (2018). IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y REGISTRO DE Aphelenchoides spp. EN CULTIVOS COMERCIALES DE Hydrangea EN ANTIOQUIA, COLOMBIA. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 377 - 384.
- minambiente. (22 de junio de 2007). Resolución por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Colombia: Ministerio del Medio Ambiente.
- Sakr, N. (2015). Phenotypical characterization in Plasmopara halstedii. *Botanica Complutensis*, 7-18.
- Sandoval, R. (2015). Determinación molecular de especies de Pratylenchus asociadas a cultivos agrícolas de Costa Rica. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.

SAP. (07 de 09 de 2019). *Introductory Plant Pathology Resources*.

Shurtleff, M., & Averre, C. (1997). *Diagnosing Plant Diseases Caused by Nematodes*. St. Paul: American Phytopathological Society.

Talavera, R. (2003). *Manual de Nematología Agrícola. Introducción al análisis y al control nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensa vegetal*. Brasil: Instituto de Formación Agraria y Pesquera.

Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Genero *Fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*, 85.

ANEXOS

Anexo 1: Preparación de medios, soluciones y gel de agarosa empleados en el LCV

Medios de cultivo para hongos:

Preparación de medio PDA + Antibiótico Cloranfenicol (preparación para 1 L)

Materiales

- Agar PDA (Agar papa dextrosa)
- Agua destilada
- Solución de Cloranfenicol

Procedimiento

- Pesar 39 g de agar PDA, diluir en 1 litro de agua destilada. Disolver
- Adicionar 1000 μ L de solución de Cloranfenicol
- Agitar y llevar a ebullición por tres veces seguidas.
- Tapar con papel aluminio y colocar cinta indicadora de esterilización.
- Autoclavar a 121°C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y servir en cajas de Petri, en cabina de flujo limpia y con mecheros encendidos.
- Dejar enfriar y registrar número de lote, fecha de preparación y reservar 4 cajas para control de medios, las demás se reservan para uso.

Preparación de solución de Antibiótico Cloranfenicol (preparación para 10 mL)

Materiales

- Reactivo sólido de Cloranfenicol
- Etanol al 90%

Procedimiento

- Diluir 0,5 g de Reactivo sólido de Cloranfenicol en 10 mL de etanol al 90%

Preparación de medio Agar- Agar (preparación para 1 L)

Materiales

- Agar agar
- Agua destilada

Procedimiento

- Pesar 15 g de agar agar.
- Adicionar 1 L de agua destilada, disolver completamente.
- Agitar y llevar a ebullición por tres veces seguidas.
- Tapar con papel aluminio y colocar cinta indicadora de esterilización.
- Autoclavar a 121°C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y servir en cajas de Petri, en cabina de flujo limpia y con mecheros encendidos.
- Dejar enfriar y registrar número de lote, fecha de preparación y reservar 4 cajas para control de medios, las demás se reservan para uso.

Preparación de medio CLA (preparación para 1 L)

Materiales

- Agar agar
- Tozos de 0,5 cm de hoja de clavel autoclavados
- Agua destilada

Procedimiento

- Pesar 15 g de agar agar.
- Adicionar 1 L de agua destilada, disolver completamente.
- Agitar y llevar a ebullición por tres veces seguidas.
- Tapar con papel aluminio y colocar cinta indicadora de esterilización.
- Autoclavar a 121°C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y servir en cajas de Petri, en cabina de flujo limpia y con mecheros encendidos.
- Dejar enfriar
- Adicionar 5 trozos de tejido por cada caja de medio, sellar con papel film

- Registrar en cada caja el número de lote, fecha de preparación y reservar 4 cajas para control de medios, las demás se reservan para uso.

Preparación de medio SNA (preparación para 1 L)

Materiales

- 1 g de Potasio Fosfato monobásico cristal - KH_2PO_4
- 1 g de Nitrato de Potasio - KNO_3
- 0,5 g de Sulfato de Magnesio heptahidratado - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g de Cloruro de Potasio- KCl
- 0,2 g de Glucosa dextrosa
- 0,2 g de Sucrosa Sacarosa
- 20 g de Agar
- Agua destilada

Procedimiento

- Diluir todos los componentes en un litro de agua destilada, disolver bien.
- Agitar y llevar a ebullición por tres veces seguidas.
- Tapar con papel aluminio y colocar cinta indicadora de esterilización.
- Autoclavar a 121°C , 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y servir en cajas de Petri, en cabina de flujo limpia y con mecheros encendidos.
- Dejar enfriar y registrar número de lote, fecha de preparación y reservar 4 cajas para control de medios, las demás se reservan para uso.

Preparación de medio PVLG - alcohol polivinílico-glicerol (preparación para 50 mL)

Materiales

- Alcohol polivinílico
- Glicerina
- Ácido Láctico
- Agua destilada

Procedimiento

- Adicionar en un Erlenmeyer 8,33 g de cristales de alcohol polivinílico y 50 mL de agua destilada
- Calentar con agitación constante y a baja temperatura durante aproximadamente 30 min sobre placa de calentamiento, hasta obtener la dilución completa de los cristales, obteniendo un líquido totalmente transparente y sin grumos.
- Adicionar poco a poco los demás componentes, sin dejar de agitar. Una vez que se observe una mezcla homogénea se debe reservar hasta su uso, cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz y a temperatura ambiente.

Medios de cultivo para bacterias:

Preparación de medio Nutritivo (preparación para 1 L)

Materiales

- Agar nutritivo
- Agua destilada

Procedimiento

- Pesar 28 g de agar nutritivo.
- Adicionar 1 L de agua destilada, disolver completamente.
- Agitar y llevar a ebullición por tres veces seguidas.
- Tapar con papel aluminio y colocar cinta indicadora de esterilización.
- Autoclavar a 121°C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y servir en cajas de Petri, en cabina de flujo limpia y con mecheros encendidos.
- Dejar enfriar y registrar número de lote, fecha de preparación y reservar 4 cajas para control de medios, las demás se reservan para uso.

Medios de cultivo para pruebas bioquímicas - bacterias:

Preparación de SIM medio (preparación para 50 mL)

Materiales

- Medio SIM (Sulfuro Indol Movilidad)
- Agua destilada

Procedimiento

- Pesar 1,5 g de agar SIM.
- Adicionar 50 mL de agua destilada, disolver completamente.
- Agitar y llevar a ebullición por tres veces seguidas.
- Tapar con papel aluminio y colocar cinta indicadora de esterilización.
- Autoclavar a 121°C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y servir 5 mL en cada tubo de tapa rosca estéril (Total 10 tubos), cada uno en cabina de flujo limpia y con mecheros encendidos. El tubo **NO** debe quedar acostado si no recto para poder ver adecuadamente la movilidad de las bacterias en él.
- Dejar enfriar y registrar número de lote, fecha de preparación.

Preparación de Agar Urea Base (preparación para 50 mL)

Materiales

- Medio Agar Urea
- Urea al 40%
- Agua destilada

Procedimiento

- Pesar 1,2 g de agar Urea.
- Adicionar 50 mL de agua destilada, disolver completamente.
- Agitar y llevar a ebullición por tres veces seguidas.
- Tapar con papel aluminio y colocar cinta indicadora de esterilización.
- Autoclavar a 121°C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y adicionar urea 11.4 mL de Urea al 40%, cuando el medio aun este tibio.

- Servir 5 mL en cada tubo de tapa rosca estéril (Total 10 tubos), cada uno en cabina de flujo limpia y con mecheros encendidos. El **tubo** debe quedar **inclinado**, para que sea más fácil la siembra sobre la superficie ya que es por agotamiento.
- Dejar enfriar y registrar número de lote, fecha de preparación.

Preparación de TSI (preparación para 50 mL)

Materiales

- Medio TSI (Triple Sugar Iron)
- Agua destilada

Procedimiento

- Pesar 3,25 g de agar TSI.
- Adicionar 50 mL de agua destilada, disolver completamente.
- Agitar y llevar a ebullición por tres veces seguidas.
- Tapar con papel aluminio y colocar cinta indicadora de esterilización.
- Autoclavar a 121°C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y servir 5 mL en cada tubo de tapa rosca estéril (Total 10 tubos), cada uno en cabina de flujo limpia y con mecheros encendidos. El **tubo** debe quedar **inclinado**, para que sea más fácil la siembra sobre la superficie ya que es por agotamiento.
- Dejar enfriar y registrar número de lote, fecha de preparación.

Preparación de Agar Citrato (preparación para 50 mL)

Materiales

- Medio Agar Citrato
- Agua destilada

Procedimiento

- Pesar 1,21 g de agar Citrato.
- Adicionar 50 mL de agua destilada, disolver completamente.
- Agitar y llevar a ebullición por tres veces seguidas.

- Tapar con papel aluminio y colocar cinta indicadora de esterilización.
- Autoclavar a 121°C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y servir 5 mL en cada tubo de tapa rosca estéril (Total 10 tubos), cada uno en cabina de flujo limpia y con mecheros encendidos. El **tubo** debe quedar **inclinado**, para que sea más fácil la siembra sobre la superficie ya que es por agotamiento.
- Dejar enfriar y registrar número de lote, fecha de preparación.

Soluciones reactivas para Biología Molecular – Extracción

Preparación de solución D-Sorbitol 1M (preparación para 100 mL)

Materiales

- D-Sorbitol
- Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas

Procedimiento

- Adicionar 18,217 g de D-Sorbitol en 100 mL de Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas
- Autoclavar y almacenar de 2 a 8°C.

Preparación de solución Tris 1M (preparación para 100 mL)

Materiales

- Tris (tri hidroximetil aminometano)
- Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas

Procedimiento

- Adicionar 12,114 g de Tris en 100 mL de Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas
- Ajustar el pH a 8 con HCl
- Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de solución EDTA 0,5 M (preparación para 100 mL)

Materiales

- EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético)
- Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas

Procedimiento

- Adicionar 18,61 g de EDTA en 100 mL de Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas
- Ajustar el pH a 8 con NaOH
- Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de solución CTAB 0,2M (preparación para 100 mL)

Materiales

- CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)
- Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas

Procedimiento

- Adicionar 7,289 g de CTAB en 100 mL de Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas
- Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de solución Beta-mercaptoetanol 10 % (preparación para 10 mL)

Materiales

- Beta-mercaptoetanol
- Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas

Procedimiento

- Adicionar 1mL de reactivo puro en 9 mL de Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas
- Almacenar de 2 a 8°C.

Preparación de CTAB Buffer (preparación para 100 mL)

Materiales

- Tris-Cl 1M de pH 8.4
- NaCl
- EDTA 5.0 M de pH 8.0
- Solución de CTAB (2 g CTAB en 100 mL agua para molecular disuelto en baño María a 55°C)

Procedimiento

- Adicionar 10 mL de solución Tris
- Luego 8.18 g de NaCl
- 5 mL de EDTA
- Y la solución de CTAB.
- Se debe preparar y autoclavar

Preparación de solución N-Lauroilsarconin sal de sodio 5% (preparación para 50 mL)

Materiales

- N-Lauroilsarconin sal de sodio
- Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas

Procedimiento

- Adicionar 2,5 g de reactivo en 50 mL de Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas
- Autoclavar y almacenar de 2 a 8°C.

Preparación de solución Acetato de Potasio 5M (preparación para 50 mL)

Materiales

- Acetato de Potasio
- Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas

Procedimiento

- Adicionar 24,542 g de reactivo en 50 mL de Agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas
- Ajustar el pH a 5,5 con Ácido acético glacial
- Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

Soluciones reactivas para Biología Molecular – PCR

Materiales

- Buffer
- MgCl₂
- Primer's forward y reverse *
- dNTP's
- Taq Polimerasa
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL

Procedimiento

- Se toman alícuotas de cada solución por separado y se introduce cada una por separado en su respectivo tubo Eppendorf de 1,5 mL. La idea es que cada alícuota funcione para máximo 5 reacciones.
- Se marcan con el nombre y fecha.
- Se llevan a congelador de -20°C para su conservación y posterior uso.

* En el LCV los primers usados para detección generalizada de hongos son los ITS, para bacterias son 16S.

Gel de agarosa para Biología Molecular – Electroforesis

Preparación de geles de agarosa (preparación para 100 ml)

Materiales

- TBE 1X 2L
- Agarosa 1,5 g

- SYBR safe DNA 20 μ l

Procedimiento

- Colocar en un erlenmeyer 1,5 g de agarosa, adicionar 100 ml de TBE 1X
- Llevar al horno microondas hasta homogenizar (Aprox 1 min)
- Llevar a un recipiente con agua para que enfríe un poco. Un gel demasiado caliente deforma los peines de la caja de electroforesis y demasiado frio se coagula en el servido dejando el gel desnivelado e imperfecto, lo cual no permite que el ADN corra de forma correcta. Así que debe quedar de calor soportable al tacto.
- Aplicar 20 μ l de SYBR safe (revelador que tiñe el ADN y lo hace visible a la luz ultravioleta emitida por el transiluminador) y agitar moviendo el erlenmeyer hasta disolver completamente.
- Llevar el contenido previamente mezclado al molde o caja con los peines requeridos para el número de muestras a correr, verificando que el peine no toque la superficie de la caja porque no se forma el pozo si no un hueco y la muestra traspasaría el gel, tampoco debe quedar el pozo muy superficial porque se sale la muestra y se puede pasar de un pozo al otro. Igualmente no deben quedar burbujas que me impidan el corrido adecuado del ADN.
- Dejar durante 20 minutos que se gelifique y retirar los peines. Queda listo para la siembra de muestras.

Preparación de TBE 1X (preparación para 1 L)

Materiales

- 17 g de TBE (Tris-Borate-EDTA)
- Agua destilada desionizada

Procedimiento

- Diluir todos los componentes en un litro de agua destilada desionizada, disolver bien.

Preparación de revelador de electroforesis SYBR safe (preparación para 1000 µl)

Materiales

- Tubo Eppendorf de 1,5 mL
- 100 µl de SYBR safe
- 900 µl de TBE 1X

Procedimiento

- Se adicionan las soluciones en el tubo Eppendorf, se agitan y se envuelve con papel aluminio, la tapa se oscurece con marcador ya que es muy sensible a la degradación por luz.
- Se marca con fecha y se deja en refrigeración a 4°C.

Anexo 2: Metodologías para extracción de Nematodos

Método Baermann

Materiales:

- 100 g de suelo o muestra de tejido foliar o radicular
- Embudo de vidrio
- Manguera de 10 cm de largo
- Pinza Mohr
- Base para embudos
- Pañuelos faciales desechables
- Beaker de 100 ml

Procedimiento

- Colocar el embudo con su respectiva manguera sobre un soporte (en el LCV los embudos son adheridos a las mangueras y envueltos en papel aluminio para ser autoclavados)
- Sujete la pinza Mohr de extremo sobrante de la manguera, esto evitar la salida del líquido.
- Coloque el suelo sobre tres capas de pañuelos faciales desechables.
- Envuelva perfectamente y coloque sobre el embudo.
- Llene con mucho cuidado el embudo con agua destilada estéril

- Deje pasar entre 48 y 72 horas. Al cabo de este tiempo los nematodos habrán migrado al agua y de esta a la manguera.
- Abrir la pinza Mohr y recolectar el agua en una caja de Petri (esta es la muestra para que sea analizada).

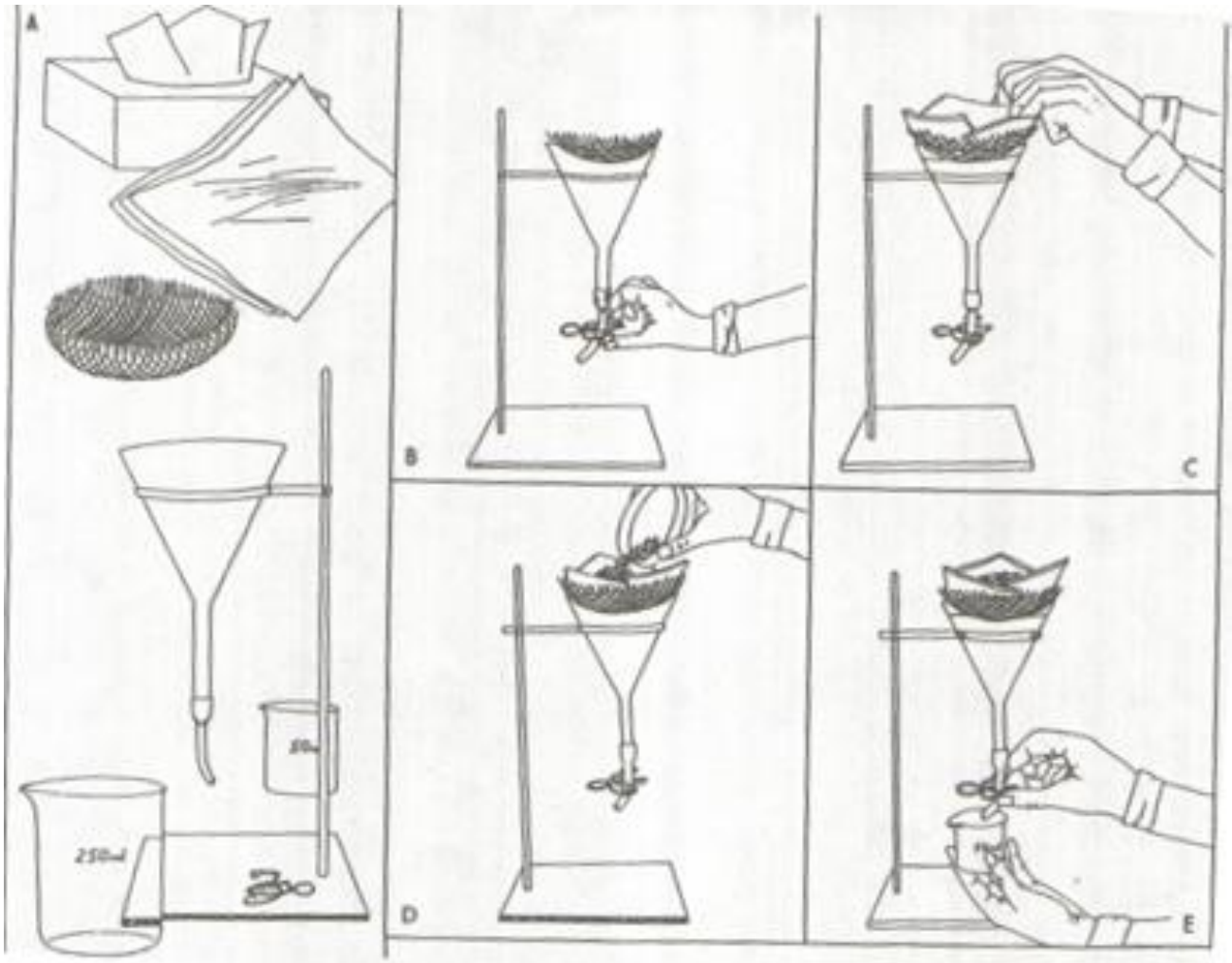
Método tamices Cobb's

Materiales:

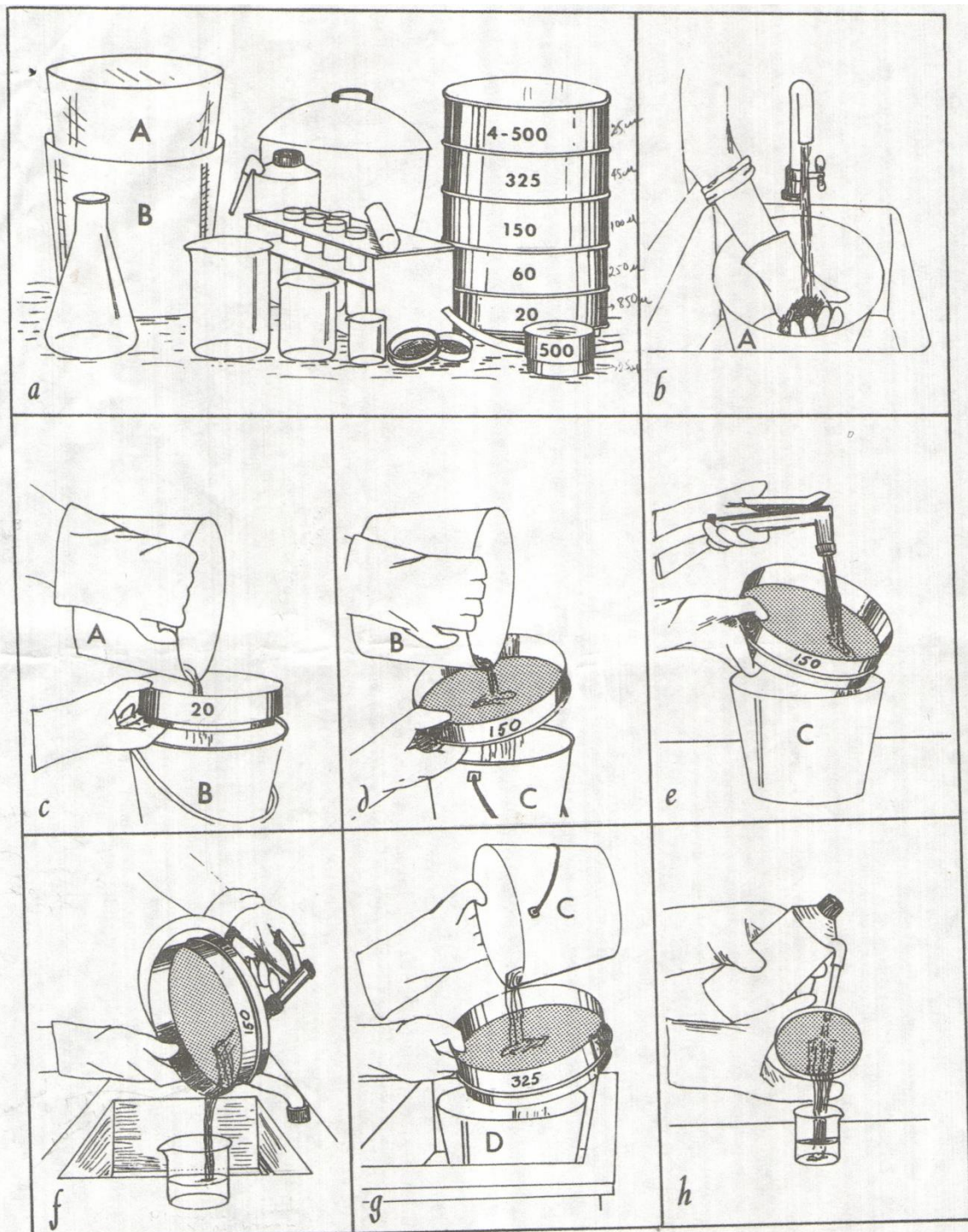
- 100 g de suelo
- Juego de tamices
- Balde de 10 L
- Beaker de 100 ml

Procedimiento

- Adicionar 100 g de suelo en el balde con más o menos 2 L de agua
- Agitar bien para separar los nematodos de las partículas de suelo y para disolver posibles agregados o terrones.
- Pase la suspensión al tamiz de poro más grande, descartando el material que ha quedado en el tamiz ya que los nematodos han pasado al tamiz de poro más pequeño.
- Repita la operación según cuantos tamices tenga o necesite según el tamaño del nematodo a determinar, Cuando llegue al tamiz que lo puede retener enjuáguelo en un Beaker.



Montaje para Extracción por el método Baermann. Tomado de: (Shurtleff & Averre, 1997)



Montaje para Extracción por el método de tamices Cobb's. Tomado de: (Shurtleff & Averre, 1997)

Anexo 3: Realización de impronta para observar estructuras de hongos y oomycetes

Materiales

- Caja de Petri estéril
- Lamina de vidrio para microscopio
- Cinta transparente delgada
- Azul de Lactofenol

Procedimiento

- En cabina de flujo laminar, limpia, estéril y con mecheros encendidos.
- Realizar un corte del borde de la colonia y se trasfiere a una caja de Petri estéril.
- Se cierra la caja que contiene la colonia y se sella por sus bordes con papel film.
- Se reserva.
- Se toma una lámina de vidrio y se adiciona una gota de azul de lactofenol
- Se toma la porción de colonia extraída y se le hace un pase con la cinta pegante por el lado donde tiene el pegante.
- Se pega la cinta sobre la gota de azul de lactofenol que está en la laminilla
- Se pasa al microscopio para observación.

Anexo 4: Montaje de microcultivos para hongos

Materiales

- Cajas de Petri
- Papel de filtro
- Pitillos agitadores para café
- Laminas
- Laminillas
- Medio PDA
- Pipeta Pasteur estéril
- Cultivo de hongo
- Asa micológica

Procedimiento

- Colocar 2 papel de filtro en el fondo de la caja de Petri y encima de esta 2 pitillos formando un triángulo, sobre este disponer una lámina y a cada lado una laminilla.
- Envolver en papel kraf y Autoclavar a 121°C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- Dejar enfriar
- Adicionar aproximadamente de 1 a 2 gotas de medio sobre cada esquina de la lámina, ayudándonos de una pipeta Pasteur estéril. Dejar solidificar.
- Realizar la siembra del hongo seleccionado tomando un poco de micelio del mismo y colocándolo en el borde del medio.
- Cubrir el montaje con cada laminilla.
- Adicionar agua destilada estéril sobre el papel de forma cuidadosa para que no caiga sobre el montaje y que apenas logre humedecer el papel de filtro, sin encharcamientos.
- Tapar e incubar a 25°C +/- 2 °, durante 7 días.

Anexo 5: Diluciones para montaje de bacterias

Materiales

- Solución salina
- Agua destilada estéril
- Tubo Eppendorf de 2 mL

Procedimiento

- Se adiciona una solución salina de NaCl y agua estéril
- Se macera y se deja 10 min a temperatura ambiente ó en agitación (125 RPM x 10 min).
- Marcar los tubos de 1,5 ml con las diluciones de -1 a -4 para cada muestra
- Aplicar 900 µl de agua destilada estéril a cada tubo
- Tomar 100 µl del macerado original y adicionar en el tubo -1 y homogenizar. Luego tomar del tubo -1 100µl y pasar al tubo -2 y homogenizar. Realizar esta acción hasta el tubo -4
- Previamente se marcan las cajas de Petri con medio a utilizar para cada muestra y se siembran las soluciones -2 y -4
- Se aplican perlas de vidrio estériles para dispersar la siembra

Anexo 6: Tinción Gram para bacterias

Materiales

- Cristal violeta
- Yodo
- Acetona y etanol en proporción 1:1
- Safranina
- Agua estéril
- Lamina

Procedimiento

- Colocar 1 gota de agua estéril sobre la lámina de vidrio y transfiera a ella un poco de la muestra de la colonia con la ayuda de un asa estéril y disolverla en la gota de agua. Dejar secar al ambiente.
- Fijar la muestra por calor pasándola sobre un mechero, esto evita que se enjuaguen durante la tinción.
- Adicionar cristal violeta empapando la muestra, esperar 1 minuto, este tiñe la pared celular de las bacterias
- Enjuagar levemente con agua destilada
- Adicionar Yodo que cubra la muestra y esperar 1 minuto y enjuagar. Este Yodo se une al cristal violeta y lo fija.
- Adicionar Alcohol- Cetona enjuagando la muestra por 3-5 segundos. Este decolora un poco las bacterias, por eso no se puede dejar por más tiempo.
- Adicionar Safranina cubriendo la muestra por mínimo 45 segundos. Este colorea las bacterias Gram negativas.

Anexo 7: Métodos de Extracción de ADN y ARN empleados en el LCV

Actividades Previas

Alistamiento de material:

- Esterilizar el material requerido: tubos Eppendorf de 1,5 ml; puntas de 2-10 μ l, de 20-200 μ l y de 200- 1000 μ l.

- Marcar los tubos y las columnas para cada muestra a analizar. Es conveniente realizar este paso previamente ya que los periodos de incubación son cortos y no permiten realizarlo durante el proceso
- Se deben realizar los procedimientos en cabina de extracción.

Liofilizado y macerado

- Extraer de la planta hojas jóvenes y llevar a un mortero, macera con nitrógeno líquido hasta romper todas las fibras y obtener una muestra homogénea, luego pesar 100 mg de tejido vegetal en tubos Eppendorf de 2 ml. Si se trata de micelio para extracción de hongos, se debe recolectar este de la colonia pura, introduciéndolo en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, luego dejarlo secar durante 4 días a 45°C para obtener un liofilizado.

Extracción de ADN con kit (Qiagen DNeasy plant mini kit)

Extracción:

- Tomar la muestra y añadir 400 µl del buffer de lisis AP1 (Buffer Lisis) y 4 µl de ARNasa a (100 mg/ml)
- Mezclar por vortex e Incubar 10 minutos a 65°C, mezclando por inversión cada 5 minutos. La idea es disolverlo muy bien en el vortex.
- Retirar los tubos el baño de maría
- Agregar 130 µl de buffer AP3 (Ácido Acético para neutralizar).
- Agitar en vortex y enfriar en hielo por 5 minutos.
- Centrifugar a 20000 gravedades (14000 rpm) por 5 minutos
- Tomar el sobrenadante y transferirlo a la columna QIA sheredder mini spin (rosada). Siempre cambiando de punta entre muestra y muestra.
- Centrifugar 2 minutos a 20000 gravedades (14000 rpm)
- Transferir el sobrenadante (400µl) obtenido a un tubo de 2 ml nuevo
- Agregar 1,5 volúmenes (600 µl). de buffer AW1 (alcohol más sales que precipita el ADN).
- Mezclar por inversión
- Transferir 650 µl de la mezcla a la columna DNeasy mini spin (blanca) donde queda ya el ADN
- Centrifugar a 6000 gravedades (8000 rpm) durante 1 minuto.

- Descartar la fracción de líquido que pasa a través de la columna y con el remanente se repiten los dos pasos anteriores.
- Transferir la columna a un nuevo tubo de colecta (suministrado en el kit)
- Lavar la columna con 500 µl del buffer AW2 (Alcohol que enjuaga el ADN de la columna).
- Centrifugar a 6000 gravedades (8000 rpm) durante 1 minuto. Descartar el líquido obtenido
- Repetir el lavado agregando a la columna 500 µl del buffer AW2 y centrifugar a 20000 gravedades durante 2 minutos. para retirar residuos del buffer de lavado. Descartar el líquido obtenido
- Transferir la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 ml nuevo
- Adicionar 100 µl de AE (Cuando la extracción es para ser enviada a secuenciación no se adiciona este si no se le adiciona 50 µl de agua para uso molecular, ya que el buffer AE interfiere en la secuenciación)
- Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar 1 minuto a 6000 gravedades.

Extracción de ARN con kit *Qiagen RNeasy mini kit*

- Colocar 100 mg del material en un tubo eppendorf
- Adicionar al tubo 1 ml de RTL (lisis bufer)
- Adicionar 10 µl de mercaptoethanol al tubo eppendorf de 2 ml
- Pasar por el vortex para que se rompan las membranas del tejido.
- Centrifugar a máxima velocidad (25800 gravedades) por 3 minutos
- Pipetear el sobrenadante en dos tubos nuevos de 2 ml previamente marcados
- Adicionar un volumen de etanol al 70 % (relación 1:1), y mezclar por inversión
- Transferir el contenido de los tubos en un volumen de 700 µl a la columna del kit (tubos rosas)
- Centrifugar a 8000 gravedades por 15 segundos
- Eliminar el residuo y adicionar nuevamente 700 µl del contenido de los tubos
- Centrifugar repitiendo el paso anterior hasta agotar el contenido de los tubos.
- Adicionar 700 µl de RW1 (wash buffer)
- Centrifugar a 800 gravedades por 15 segundos y eliminar el sobrenadante
- Repetir el paso anterior
- Pasar las columnas a otros tubos de 1,5 ml, para adicionar 50 µl de agua libre de RNAsas. El agua se coloca en el centro de la columna sin tocarla. Reposar durante 5 min

- Centrifugar a 8000 gravedades por 1 min.
- Adicionar DNAsa 1/ 1 μ l
- Pasar a tubos de PCR y termociclar por 30 minutos a 37°C. Esto degrada el ADN y queda solo ARN.

Extracción de ADN método O'donell CTAB

- Tomar la muestra y adicionar 700 μ l del buffer CTAB, resuspender y agitar en vortex.
- Adicionar 700 μ l de Cloroformo, agitar 3-4 veces
- Centrifugar por 10 minutos a max velocidad (25314 gravedades)
- Se observan tres fases dentro del tubo Eppendorf, extraer la primera fase cercana a la superficie y se pasa a un tubo nuevo Eppendorf de 1,5 mL. Las fases que quedan son una de membranas y la mas al fondo son proteínas.
- Se adiciona Isopropanol en relación 1:1 con la muestra extraída, este precipita el ADN. Se mezcla por inversión.
- Introducir en congelador a -20°C durante 15 minutos.
- Sacar y centrifugar a máxima velocidad durante 1-2 minutos.
- Descartar el liquido superficial y reservar el pellet del fondo (ADN)
- Lavar con etanol al 70%, usar aproximadamente 200 μ l agitar en vortex
- Centrifugar de 2-3 min a máxima velocidad
- Descartar el liquido y centrifugar de nuevo de 10-20 segundo para terminar de separar el etanol, el poco de etanol que queda se remueve con micropipeta.
- Dejar secar por 1 hora en la cabina.
- Resuspender el pellet en 50 μ l de agua destilada desionizada de pH 8.0 o en TE de ese mismo pH.
- Incubar en baño Maria a 37°C durante 30 a 60 minutos. Reservar para uso.

NOTA: Generalmente después de una extracción se realiza electroforesis para confirmar la presencia de ADN en la muestra.

Anexo 8: Metodología para PCR

Cálculos para la master mix (mezcla maestra):

NOTA: Esta mezcla nunca lleva ADN, si no que se adiciona al mismo al final de su preparación, pero si se debe tener en cuenta la cantidad de ADN que se va a adicionar puesto que influye en el volumen total para la PCR.

Para la preparación de mezcla se debe emplear diluciones a los componentes del 1 al 5 ya que los componentes vienen en concentraciones más altas a las de uso, además muchas veces hay que dejar estos a una concentración determinada según el protocolo de análisis a aplicar.

Para esto debemos aplicar la formula $V_1C_1 = V_2C_2$, despejando V_1 así: $V_1 = V_2C_2 / C_1$

Tabla 1. Preparación del mix para 8 reacciones

| Nº. | Componente | Conce. Inicial C_1 * | Conce. Final (C_2) ** | Cálculo para 1x Reacción (V_1) | Cálculo para 8x reacciones $(V_1 * 8)$ |
|-----|-------------------|------------------------|-------------------------|------------------------------------|--|
| 1 | Buffer | 5 x | 1x | 5 μ l | 40 μ l |
| 2 | MgCl ₂ | 25 mM | 2,5 mM | 2,5 μ l | 20 μ l |
| 3 | DNTPs | 10 mM | 0,2 mM | 0,5 μ l | 4 μ l |
| 4 | Primer Forward | 10 μ M | 0,2 μ M | 0,5 μ l | 4 μ l |
| 5 | Primer Reverse | 10 μ M | 0,2 μ M | 0,5 μ l | 4 μ l |
| 6 | Taq | 5 U/ μ l | 0,3 U | *** 0,06 μ l | 0,48 μ l |
| 7 | H ₂ O | | | **** 12,94 μ l | 103,52 μ l |
| 8 | ADN objetivo | | | 3 μ l | 24 μ l |
| | | | Vol. Final (V_2) | 25 μ l | 200 μ l |


*Valores reportados en el empaque del producto.

**valores según método de análisis.

***Para la Taq polimerasa esta no es sometida a dilución si no se calcula por medio de una regla de tres, ya que esta trae 5U por cada μ l de producto.

****Volumen a tomar de agua = (volumen Final) - (suma de todos los volúmenes sin el agua (1,2,3,4,5,6 y 8))

Anexo 9: Compromiso de confidencialidad firmado en Pasantía

| | |
|--|---------------------------------------|
|  <p>ICA SUBGERENCIA DE ANÁLISIS Y DIAGNÓSTICO</p> | <p>COMPROMISO DE CONFIDENCIALIDAD</p> |
|--|---------------------------------------|

Yo, Sandra Milena Gutiérrez Chizabas identificado con cédula de ciudadanía número 52884011 expedida en Bogotá, me comprometo a:

- Cumplir las directrices éticas establecidas para garantizar la transparencia de mi labor.
- Mantener de manera confidencial la información a la que tenga acceso, los datos y resultados que produzca y mantenga el laboratorio o dependencia en donde trabajo.
- Proceder con integridad e imparcialidad en las actividades de mi puesto de trabajo y particularmente en las asociadas con la prestación de servicios de laboratorio.
- Aplicar las políticas, manuales, procedimientos, instructivos, métodos analíticos y formas definidas para mi puesto de trabajo.
- Emplear los recursos disponibles en forma racional para la ejecución exclusiva de las funciones que me han sido asignadas.
- Seguir las disposiciones que en materia de bioseguridad y seguridad ocupacional tenga el laboratorio de acuerdo a la información recibida.
- Evitar la sustracción de información, muestras, resultados de análisis, documentación, reactivos, equipos o materiales del laboratorio para mi beneficio personal o el de terceros.

Para constancia firmo a los 01 días del mes de Agosto del año 2019.

NOMBRES y APELLIDOS: Sandra Milena Gutiérrez Chizabas

FIRMA: Sandra M. Gutiérrez

FORMA 3-183. VERSIÓN 02.2016

