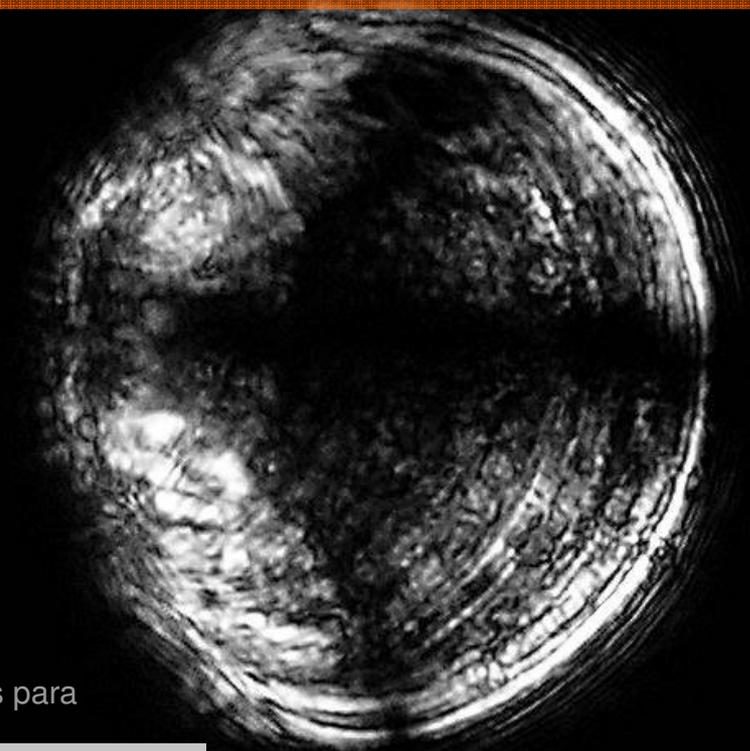




CAMPAÑA DE DETECCIÓN PRECOZ BASADA EN
TÉCNICAS GENÉTICAS

Dreissena polymorpha
CUENCA HIDROGRÁFICA DEL EBRO

octubre 2010



Un informe de Cimera Estudios Aplicados para



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

CONFEDERACIÓN
HIDROGRÁFICA
DEL EBRO

Índice

0	<i>Datos generales</i>	2
1.	<i>Introducción y Objetivos</i>	3
2.	<i>Alcance</i>	4
3.	<i>Metodología</i>	5
3.i	<i>TOMA DE MUESTRAS</i>	5
3.ii	<i>DETECCIÓN</i>	6
4.	<i>Resultados</i>	7

0. Datos generales

0.1. Datos del organismo solicitante

0.1.1. NOMBRE DE LA EMPRESA/ORGANISMO ACTUANTE

Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Confederación Hidrográfica del Ebro

0.1.2. ACTIVIDAD PRINCIPAL

Organismo Gestor de Cuenca.

0.1.3. PERSONA DE CONTACTO

D^a. Concha Durán Lalaguna

D^a Antonia Anadón Marco

0.2. Datos de la entidad actuante

0.2.1. NOMBRE DE LA EMPRESA ACTUANTE

CIMERA ESTUDIOS APLICADOS, S. L.

0.2.2. DOMICILIO

Parque Científico de Madrid.

P.T.M. – C/ Santiago Grisolia 2

28760 Tres Cantos (Madrid)

0.2.3. TÉCNICO RESPONSABLE

José Miguel Rodríguez Cristóbal (Ldo. CC. Biológicas).

Santiago Robles Clarós (Ldo. CC. Biológicas).

0.2.4. LABORATORIO

CIMERA ESTUDIOS APLICADOS, S. L.

PARQUE CIENTÍFICO DE MADRID

0.2.5. IDENTIFICACIÓN INFORME

Informe nº **SJ_054/2010_CHE**

1. Introducción y Objetivos

El presente trabajo ha sido encargado por la Confederación Hidrográfica del Ebro a Cimera Estudios Aplicados y se enmarca dentro del Plan de Choque para el control de la invasión de Mejillón Cebra que éste organismo mantiene desde el año 2007.

De entre los múltiples objetivos desarrollados en dicho documento, está el de establecer un seguimiento larvario de la población de este molusco bivalvo en las masas de agua gestionadas por la Demarcación Hidrográfica del Ebro. Desde la puesta en marcha del Plan de Choque, dicho objetivo viene siendo desarrollado por este organismo por medio del muestreo y detección por medios ópticos, a lo largo de los últimos tres años.

Las técnicas de muestreo y detección basadas en biología molecular permiten, una vez puestas a punto, la identificación de incluso fracciones incompletas de un solo individuo en muestras procedentes de filtrados planctónicos. Con este prometedor planteamiento, Cimera comenzó en el año 2009 los primeros ensayos para la puesta en marcha de una técnica protocolizada para la detección de la presencia de individuos de esta especie mediante el uso de técnicas genéticas. Gracias al apoyo de la Confederación Hidrográfica del Ebro, se pudo alcanzar un primer hito al conseguir un protocolo funcional para el uso de la técnica en muestras puras (sin interferentes químicos o biológicos) que recientemente ha concluido satisfactoriamente y puede ser aplicado en muestras reales procedentes de un filtrado real de una masa de agua.

Como resumen de las mejoras que actualmente ofrece esta técnica podríamos citar:

- i) Elimina posibles errores en la identificación taxonómica: Este aspecto resulta especialmente interesante en muestras en las que el estado de conservación o de desarrollo de los individuos no permite una seguridad en la identificación.
- ii) Disminuye el rango de detección: En muestras en las que la presencia de larvas se reduce a sólo unas pocas unidades o en aquellas que presentan gran cantidad de materia en suspensión la observación por medios ópticos puede resultar en falsos negativos. Las técnicas de detección basadas en la identificación de fragmentos específicos de la cadena de ADN permiten la detección de incluso fragmentos de un individuo.
- iii) Las particularidades metodológicas de las técnicas genéticas permiten la identificación en masa de gran cantidad de muestras al mismo tiempo, lo que reduce considerablemente los tiempos de disponibilidad de resultados respecto a las técnicas de microscopía óptica. Este aspecto resulta de especial interés en la identificación de esta especie cuya detección precoz se considera uno de los aspectos claves para su control.
- iv) Las cualidades conjuntas de una alta especificidad y una alta sensibilidad, permiten que gracias a esta técnica se amplíe el periodo del año durante el que es posible detectar de forma precoz larvas ya que es posible hacerlo en estadios primarios no distinguibles al microscopio.
- v) Las técnicas de muestreo para la aplicación de estas técnicas adoptan particularidades propias de los muestreos microbiológicos que aseguran la ausencia de falsos positivos producidos por contaminación de los equipos de muestreo.

En el presente informe se resumen los protocolos y resultados de los primeros trabajos en condiciones reales para el uso de esta técnica que han sido desarrollados en 10 embalses seleccionados por la C.H. del Ebro de entre todos los que gestiona actualmente.

2. Alcance

El alcance del presente informe es describir la metodología y resultados de una campaña de muestreo para la detección precoz de la presencia de *Dreissena polymorpha* en masas de agua mediante el uso de metodologías de detección basadas en técnicas genéticas.

Un total de 10 masas de agua repartidas por toda la cuenca forman parte de este estudio:

Masa de agua	Ubicación	Código
Embalse de Barasona	Resordi, Lleida	E0056-01
Embalse de Búbal	Hoz de Jaca, Huesca	E0025-00
Embalse de La Tranquera	Carenas, Zaragoza	E0076-00
Embalse de Lanuza	Lanuza, Huesca	E0019-00
Embalse de Rialb	Gualter, Lleida	E0063-00
Embalse de Sabiñánigo	Sabiñánigo, Huesca	E0039-00
Embalse de Sant Llorenç	Sant Llorenç de Montgai, Lérida	E0041-00
Embalse de Talarn	Talarn, Lérida	E0050-00
Embalse de Uribarri-Gamboa	Uribarri-Gamboa, Álava	E0007-00
Embalse de Utxesa	Utxesa, Lérida	E1679-01

En cada una de estas masas de agua se tomó una muestra simple en la misma ubicación en la que de manera sistemática viene haciéndose para la detección precoz por medios ópticos.

3. Metodología

i. TOMA DE MUESTRAS

El muestreo para cada punto se realizó exclusivamente en orilla mediante vadeo a pie hasta una zona con la máxima profundidad posible. El agua de la muestra se hizo pasar por un sistema de filtrado en serie compuesto por dos filtros superpuestos de 500 micras y 50 micras respectivamente con el objetivo de eliminar la materia gruesa y con ella la mayor cantidad posible de interferentes innecesarios en la muestra.

Los filtros de nylon utilizados fueron desechables y del mismo modo para evitar contagios inter-muestra, todas las superficies en contacto con el agua se cubrieron con film, plástico o material desechable. De esta manera se asegura que ningún elemento del conjunto de muestreo permanece en contacto con agua de dos puntos de muestreo distintos.



La muestra sobre el filtro de mayor tamaño (500 micras) se desechó y la recogida en el filtro de 50 micras se recogió en un frasco de PET de 90 ml que se etiquetó convenientemente y se almacenó en nevera refrigerada a 4°C listo para su procesado.

Posteriormente a cada muestreo se aplicó un tratamiento con una disolución de hipoclorito sódico en agua (5 mg/l), pulverizada sobre todo el material en contacto con el agua (cubos, botas, soportes de filtrado...). El resto del material como filtros de nylon y plásticos de recubrimiento se trató con la misma solución de hipoclorito sódico y se almacenó para su posterior eliminación.

ii. DETECCIÓN

La evaluación de la presencia de larvas de *Dreissena polymorpha* se ha realizado mediante el uso de técnicas de PCR a tiempo real: RTPCR, utilizando como sistema de detección un conjunto de sondas UPL.

La PCR es la técnica más avanzada disponible actualmente para el estudio de la expresión génica. De manera muy resumida, podríamos sintetizar el método en la detección y cuantificación de una señal luminosa (fluorescencia) emitida al producirse la reacción de unión de un fragmento de ADN molde (*primer*) con su complementario en caso de estar presente en una muestra en la que el material genético ha sido previamente purificado.

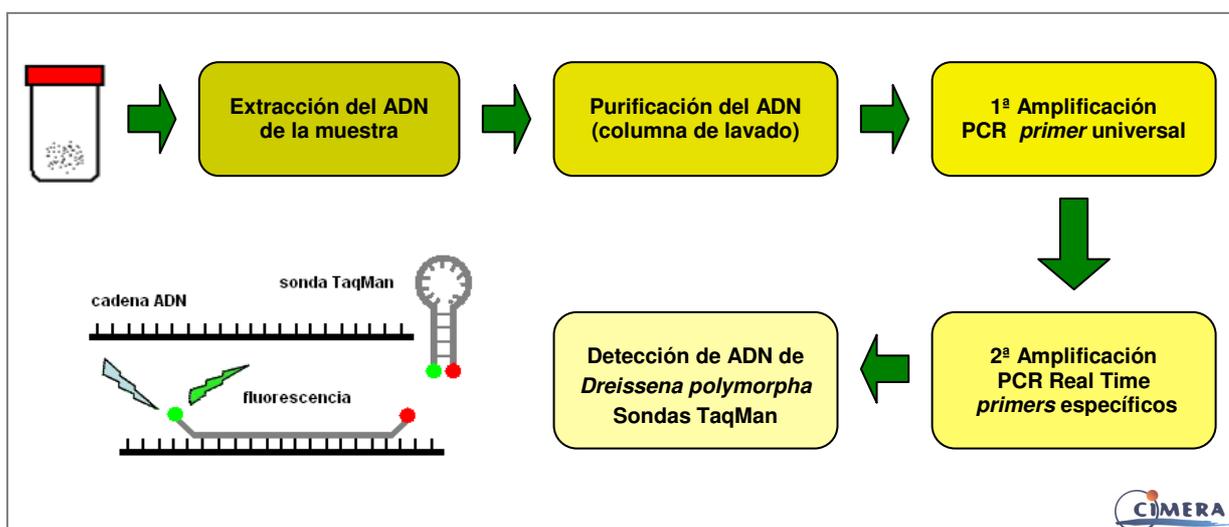


Fig. 1: Esquema metodológico de la identificación de ADN de *Dreissena polymorpha* mediante PCR a tiempo real utilizando como sistema de detección las sondas UPL.

Como resultado de la aplicación de esta técnica se registra, en caso positivo, una respuesta lumínica en el rango de longitud de onda 483-533nm que aparece en su caso tras aplicar a la muestra un número variable de ciclos de amplificación “Cp”. En los análisis cuyos resultados se muestran en este informe, se admite que una muestra que no mostrase señal antes de los 40 ciclos de amplificación aplicados, es negativa.

A continuación se resumen las principales fases del método utilizado.

1. Centrifugación de la muestra en bruto
2. Lisis de las muestras. Lisis con buffer ATL y proteinasa k incubando posteriormente a temperatura y tiempo controlados.
3. Purificación de DNA mediante el robot Qiacube y Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen).
4. Cuantificación de las muestras purificadas mediante Nanodrop.
5. Preamplificación de las muestras siguiendo el protocolo del kit Taqman preAmp Master Mix (Applied Biosystems) en Multiplex: 2 regiones con los oligos ZM42F, ZM42R, ZM134F, ZM134R y 18S. Se preamplificaron volúmenes de cada muestra correspondientes a 250ng.
6. Evaluación de la señal mediante PCR a tiempo real (RT-PCR) con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles del gen endógeno 18S se utilizó su correspondiente sonda Taqman y Master Mix de Roche para sondas.

4. Resultados

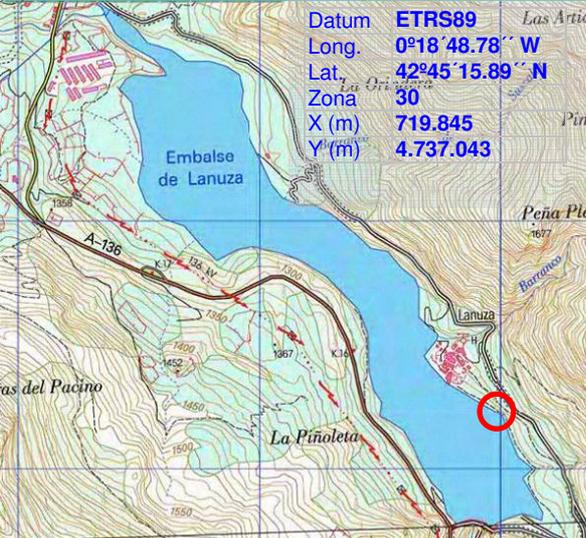
En las tablas siguientes se indican los resultados obtenidos en la presente campaña de muestreo. En ellas se incluye información sobre la metodología, fechas de muestreo, procesado y ubicación de los puntos, así como el resultado final de los análisis:

POSITIVOS: color rojo; presencia en la muestra de una secuencia genética complementaria a un fragmento específico de la secuencia genética del ADN de *Dreissena polymorpha*

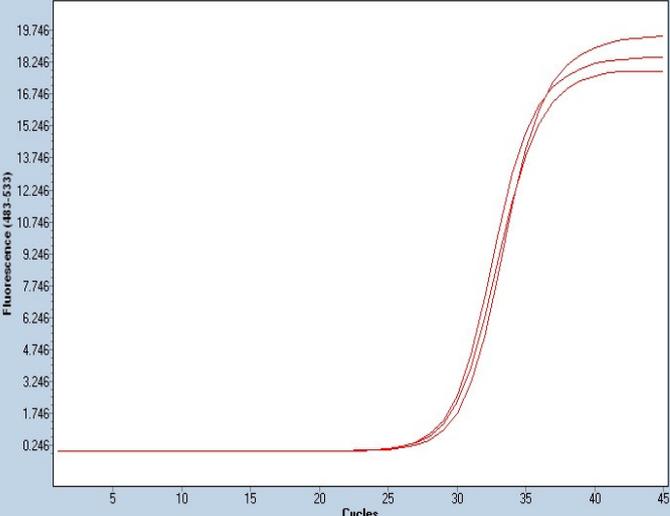
NEGATIVOS: color verde; ausencia en la muestra de una secuencia genética complementaria a un fragmento específico de la secuencia genética del ADN de *Dreissena polymorpha*

Junto a los resultados de los análisis, se indica el resultado de la observación óptica cualitativa de una réplica de la muestra tomada exactamente en las mismas condiciones.

E-0019-00 DATOS TOMA DE MUESTRAS

Masa de agua:	Embalse de Lanuza	Ubicación del punto de muestreo (Coordenadas Datum Huso)
Ubicación masa de agua (Localidad, Provincia):	Lanuza, Huesca	 <p>Datum ETRS89 Long. 0°18'48.78" W Lat. 42°45'15.89" N Zona 30 X (m) 719.845 Y (m) 4.737.043</p>
Fecha muestreo:	15/10/10	
Hora muestreo:	21:00 h	
Técnico muestreo:	J.M.R.C.	
Conservantes añadidos:	Sin conservante	
Condiciones almac:	Refrigerada (4°C)	
Envase almac.	PET 90 ml.	
Referencia muestra:	CIM_LAN1_15.10.10	
Técnica muestreo	Filtrado en serie desde orilla. Doble filtro nylon desechable 500/50 micras.	
Volumen filtrado	100 litros	
Observación adultos:	No	

E-0019-00 DATOS ANÁLISIS

Referencia muestra:	CIM_LAN_15.10.10	Curvas de Resultados para RT-PCR
Fecha entrada laboratorio:	19/10/2010	
Fecha purificación:	20/10/2010	
Fecha amplificación:	17/11/2010	
Técnico laboratorio:	S.O.A.	
Técnica analítica:	PCR a tiempo real. RT-PCR con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles de 18S se utilizaron sondas Taqman y Master Mix de Roche para sondas.	

E-0019-00 RESULTADO

Positivo a 29,62 Cp. (contraste óptico positivo)

E0056-01 DATOS TOMA DE MUESTRAS

Masa de agua:	Embalse de Barasona	Ubicación del punto de muestreo (Coordenadas Datum Huso)
Ubicación masa de agua (Localidad, Provincia):	Resordi. Lleida	
Fecha muestreo:	15/10/2010	
Hora muestreo:	14:00 h.	
Técnico muestreo:	J.M.R.C.	
Conservantes añadidos:	Sin conservantes	
Condiciones almac:	Refrigerada (4°C)	
Envase almac.	PET 90 ml.	
Referencia muestra:	CIM_BAR2_15.10.10	
Técnica muestreo	Filtrado en serie desde orilla. Doble filtro nylon desechable 500/50 micras.	
Volumen filtrado	100 litros	
Observación adultos:	No	

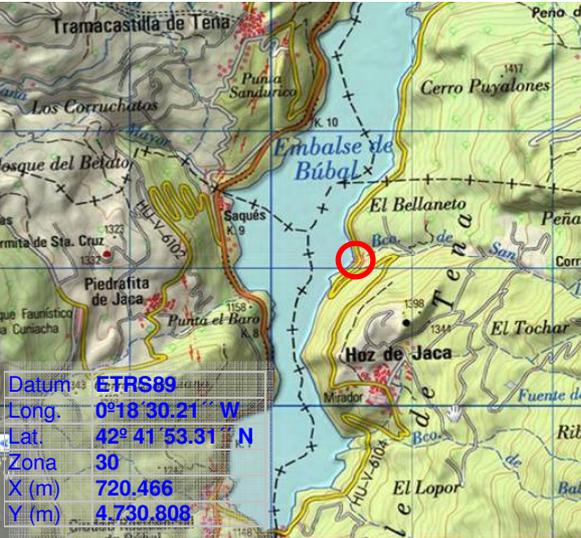
E0056-01 DATOS ANÁLISIS

Referencia muestra:	CIM_BAR_15.10.10	Curvas de Resultados para RT-PCR
Fecha entrada laboratorio:	19/10/2010	
Fecha purificación:	20/10/2010	
Fecha amplificación:	18/11/10	
Técnico laboratorio:	S.O.A.	
Técnica analítica:	PCR a tiempo real. RT-PCR con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles de 18S se utilizaron sondas Taqman y Master Mix de Roche para sondas.	

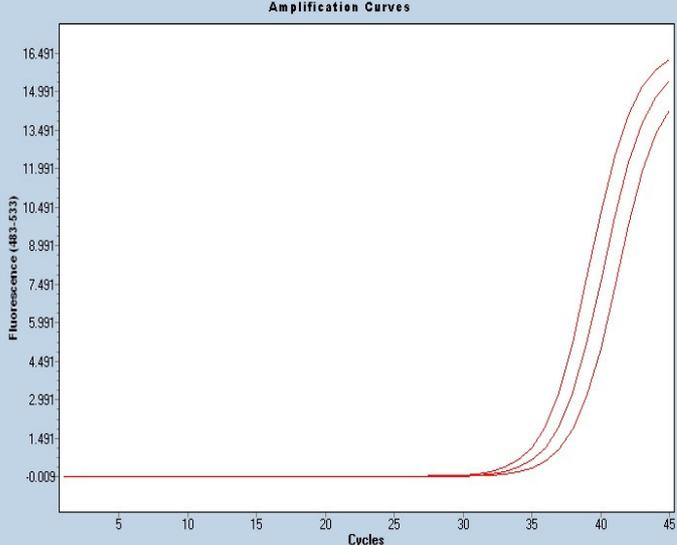
E0056-01 RESULTADO

Negativo (contraste óptico negativo)

E0025-01 DATOS TOMA DE MUESTRAS

Masa de agua:	Embalse de Búbal	Ubicación del punto de muestreo (Coordenadas Datum Huso)
Ubicación masa de agua (Localidad, Provincia):	Hoz de Jaca, Huesca	
Fecha muestreo:	15/10/2010	
Hora muestreo:	20:15 h.	
Técnico muestreo:	J.M.R.C.	
Conservantes añadidos:	Sin conservantes	
Condiciones almac:	Refrigerada (4º)	
Envase almac.	PET	
Referencia muestra:	CIM_BUB2_15.10.10	
Técnica muestreo	Filtrado en serie desde orilla. Doble filtro nylon desechable 500/50 micras.	
Volumen filtrado	100 litros	
Observación adultos:	No	

E0025-01 DATOS ANÁLISIS

Referencia muestra:	CIM_BUB_15.10.10	Curvas de Resultados para RT-PCR
Fecha entrada laboratorio:	19/10/2010	
Fecha purificación:	20/10/2010	
Fecha amplificación:	18/11/2010	
Técnico laboratorio:	S.O.A.	
Técnica analítica:	PCR a tiempo real. RT-PCR con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles de 18S se utilizaron sondas Taqman y Master Mix de Roche para sondas.	

E0025-01 RESULTADO

Positivo a 36,74 Cp (contraste óptico positivo)

E0076-01 DATOS TOMA DE MUESTRAS

Masa de agua:	Embalse de La Tranquera	
Ubicación masa de agua (Localidad, Provincia):	Carenas, Zaragoza	
Fecha muestreo:	14/10/10	
Hora muestreo:	12:20	
Técnico muestreo:	J.M.R.C.	
Conservantes añadidos:	Sin conservantes	
Condiciones almac:	Refrigerada (4°C)	
Envase almac.	PET	
Referencia muestra:	CIM_TR2_15.10.10	
Técnica muestreo	Filtrado en serie desde orilla. Doble filtro nylon desechable 500/50 micras.	
Volumen filtrado	100 litros	
Observación adultos:	No	



E0076-01 DATOS ANÁLISIS

Referencia muestra:	CIM_TR2_15.10.10	<p>Curvas de Resultados para RT-PCR</p>
Fecha entrada laboratorio:	19/10/2010	
Fecha purificación:	20/10/2010	
Fecha amplificación:	18/11/2010	
Técnico laboratorio:	S.O.A.	
Técnica analítica:	<p>PCR a tiempo real. RT-PCR con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles de 18S se utilizaron sondas Taqman y Master Mix de Roche para sondas.</p>	

E0076-01 RESULTADO

Negativo (contraste óptico negativo)

E0063-01 DATOS TOMA DE MUESTRAS

Masa de agua:	Embalse de Rialb	Ubicación del punto de muestreo (Coordenadas Datum Huso)
Ubicación masa de agua (Localidad, Provincia):	Gualter, Lérida	
Fecha muestreo:	15/10/2010	
Hora muestreo:	10:00 h	
Técnico muestreo:	J.M.R.C.	
Conservantes añadidos:	Sin conservantes	
Condiciones almac:	Refrigerada (4º C)	
Envase almac.	PET	
Referencia muestra:	CIM_RIA1_15.10.10	
Técnica muestreo	Filtrado en serie desde orilla. Doble filtro nylon desechable 500/50 micras.	
Volumen filtrado	100 litros	
Observación adultos:	No	

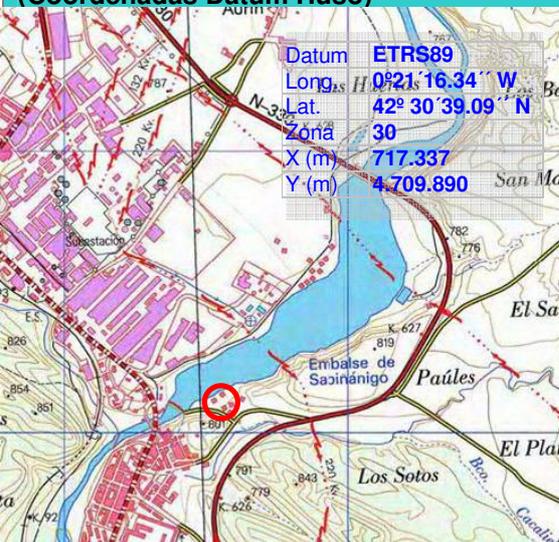
E0063-01 DATOS ANÁLISIS

Referencia muestra:	CIM_RIA1_15.10.10	Curvas de Resultados para RT-PCR
Fecha entrada laboratorio:	19/10/2010	
Fecha purificación:	20/10/2010	
Fecha amplificación:	18/11/2010	
Técnico laboratorio:	S.O.A.	
Técnica analítica:	<p>PCR a tiempo real. RT-PCR con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles de 18S se utilizaron sondas Taqman y Master Mix de Roche para sondas.</p>	

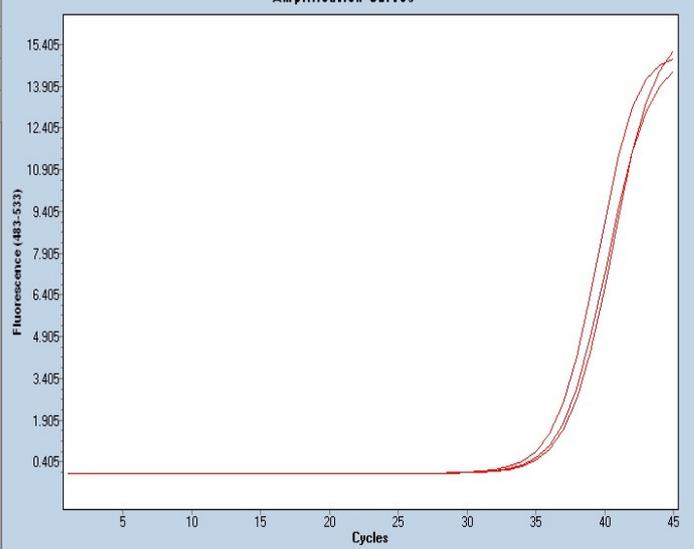
E0063-01 RESULTADO

Positivo a 35,85 Cp (contraste óptico positivo)

E0039-01 DATOS TOMA DE MUESTRAS

Masa de agua:	Embalse de Sabiñanigo	
Ubicación masa de agua (Localidad, Provincia):	Sabiñánigo, Huesca	
Fecha muestreo:	15/10/2010	
Hora muestreo:	18:00 h	
Técnico muestreo:	J.M.R.C.	
Conservantes añadidos:	Sin conservantes	
Condiciones almac:	Refrigerada (4°C)	
Envase almac.	PET	
Referencia muestra:	CIM_SAB2_15.10.10	
Técnica muestreo	Filtrado en serie desde orilla. Doble filtro nylon desechable 500/50 micras.	
Volumen filtrado	100 litros	
Observación adultos:	No	

E0039-01 DATOS ANÁLISIS

Referencia muestra:	CIM_SAB2_15.10.10	<p>Curvas de Resultados para RT-PCR</p> 
Fecha entrada laboratorio:	19/10/2010	
Fecha purificación:	20/10/2010	
Fecha amplificación:	18/11/2010	
Técnico laboratorio:	S.O.A.	
Técnica analítica:	<p>PCR a tiempo real. RT-PCR con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles de 18S se utilizaron sondas Taqman y Master Mix de Roche para sondas.</p>	

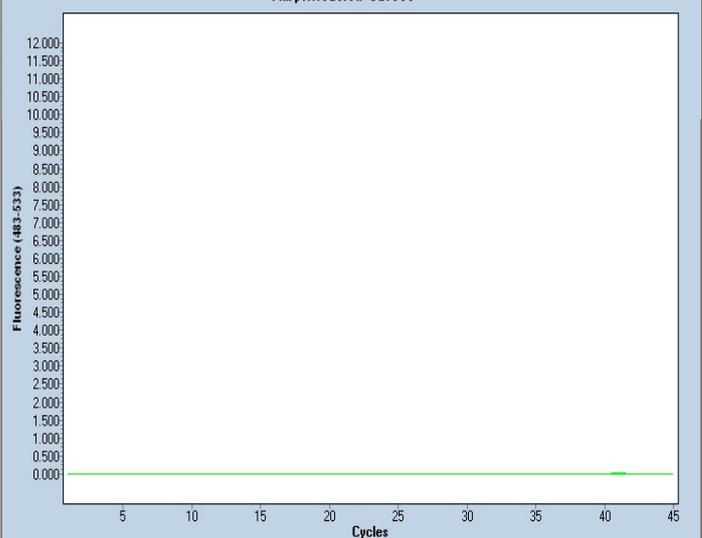
E0039-01 RESULTADO

Positivo a 36,61 Cp (contraste óptico negativo)

E0041-01 DATOS TOMA DE MUESTRAS

Masa de agua:	Embalse de San Lorenzo	Ubicación del punto de muestreo (Coordenadas Datum Huso)
Ubicación masa de agua (Localidad, Provincia):	Sant Llorenç de Montgai, Lérida	
Fecha muestreo:	14/10/2010	
Hora muestreo:	20:00	
Técnico muestreo:	J.M.R.C.	
Conservantes añadidos:	Sin conservantes	
Condiciones almac:	Refrigerada (4°C)	
Envase almac.	PET	
Referencia muestra:	CIM_LLO2_14.10.10	
Técnica muestreo	Filtrado en serie desde orilla. Doble filtro nylon desechable 500/50 micras.	
Volumen filtrado	100 litros	
Observación adultos:	No	

E0041-01 DATOS ANÁLISIS

Referencia muestra:	CIM_LLO2_14.10.10	Curvas de Resultados para RT-PCR
Fecha entrada laboratorio:	19/10/2010	
Fecha purificación:	20/10/2010	
Fecha amplificación:	18/11/2010	
Técnico laboratorio:	S.O.A.	
Técnica analítica:	PCR a tiempo real. RT-PCR con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles de 18S se utilizaron sondas Taqman y Master Mix de Roche para sondas.	

E0041-01 RESULTADO

Negativo (contraste óptico negativo)

E0050-01 DATOS TOMA DE MUESTRAS

Masa de agua:	Embalse de Talarn	Ubicación del punto de muestreo (Coordenadas Datum Huso)
Ubicación masa de agua (Localidad, Provincia):	Talarn, Lérida	
Fecha muestreo:	15/10/2010	
Hora muestreo:	12:30 h.	
Técnico muestreo:	J.M.R.C.	
Conservantes añadidos:	Sin conservantes	
Condiciones almac:	Refrigerada (4°C)	
Envase almac.	PET	
Referencia muestra:	CIM_TAL1_14.10.10	
Técnica muestreo	Filtrado en serie desde orilla. Doble filtro nylon desechable 500/50 micras.	
Volumen filtrado	100 litros	
Observación adultos:	No	



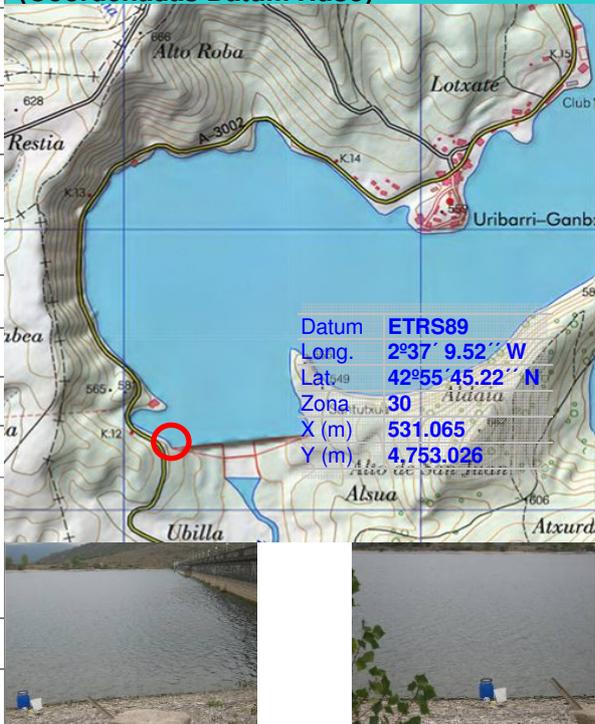
E0050-01 DATOS ANÁLISIS

Referencia muestra:	CIM_TAL1_14.10.10	Curvas de Resultados para RT-PCR
Fecha entrada laboratorio:	19/10/2010	
Fecha purificación:	20/10/2010	
Fecha amplificación:	18/11/2010	
Técnico laboratorio:	S.O.A.	
Técnica analítica:	PCR a tiempo real. RT-PCR con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles de 18S se utilizaron sondas Taqman y Master Mix de Roche para sondas.	

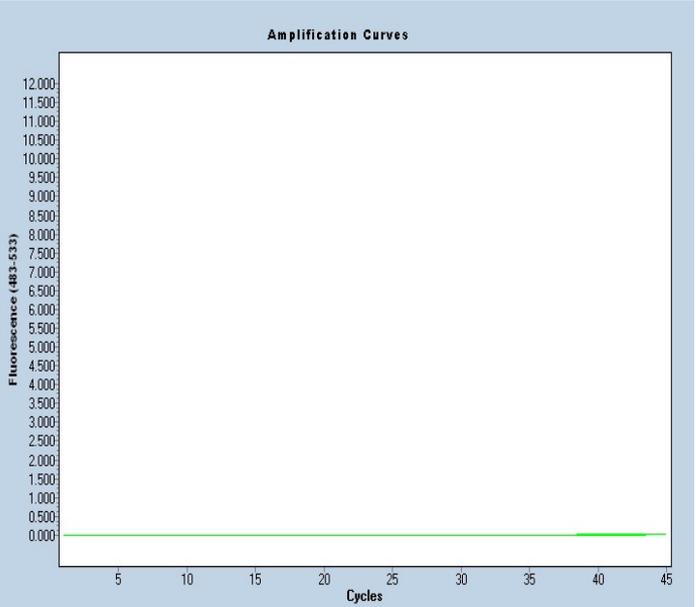
E0050-01 RESULTADO

Negativo (contraste óptico negativo)

E0007-01 DATOS TOMA DE MUESTRAS

Masa de agua:	Embalse de Uribarri-Ganboa	Ubicación del punto de muestreo (Coordenadas Datum Huso) 
Ubicación masa de agua (Localidad, Provincia):	Uribarri-Ganboa, Álava	
Fecha muestreo:	16/10/2010	
Hora muestreo:	11:30	
Técnico muestreo:	J.M.R.C.	
Conservantes añadidos:	Sin conservantes	
Condiciones almac:	Refrigerada (4°C)	
Envase almac.	PET	
Referencia muestra:	CIM_URI2_16.10.10	
Técnica muestreo	Filtrado en serie desde orilla. Doble filtro nylon desechable 500/50 micras.	
Volumen filtrado	100 litros	
Observación adultos:	No	

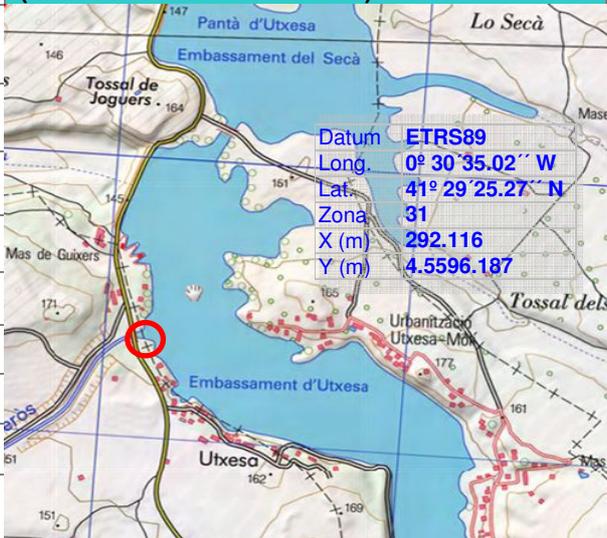
E0007-01 DATOS ANÁLISIS

Referencia muestra:	CIM_URI1_16.10.10	Curvas de Resultados para RT-PCR 
Fecha entrada laboratorio:	19/10/2010	
Fecha purificación:	20/10/2010	
Fecha amplificación:	18/11/2010	
Técnico laboratorio:	S.O.A.	
Técnica analítica:	PCR a tiempo real. RT-PCR con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles de 18S se utilizaron sondas Taqman y Master Mix de Roche para sondas.	

E0007-01 RESULTADO

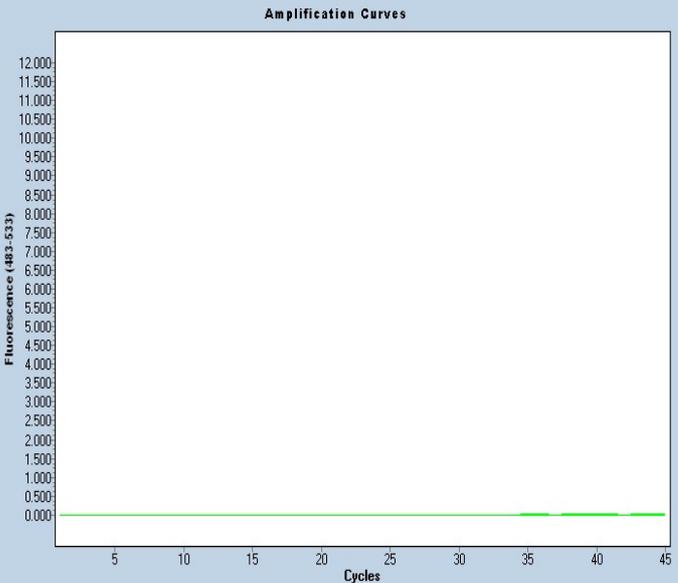
Negativo (contraste óptico negativo)

E1679-01 DATOS TOMA DE MUESTRAS

Masa de agua:	Embalse de Utchesa	Ubicación del punto de muestreo (Coordenadas Datum Huso)  <p>Datum ETRS89 Long. 0° 30' 35.02'' W Lat. 41° 29' 25.27'' N Zona 31 X (m) 292.116 Y (m) 4.5596.187</p>
Ubicación masa de agua (Localidad, Provincia):	Utchesa, Lérida	
Fecha muestreo:	14/10/2010	
Hora muestreo:	18:10 h	
Técnico muestreo:	J.M.R.C.	
Conservantes añadidos:	Sin conservantes	
Condiciones almac:	Refrigerado (4°C)	
Envase almac.	PET	
Referencia muestra:	CIM.UTC1_16.10.10	
Técnica muestreo	Filtrado en serie desde orilla. Doble filtro nylon desechable 500/50 micras.	
Volumen filtrado	100 litros	
Observación adultos:	No	



E1679-01 DATOS ANÁLISIS

Referencia muestra:	CIM.UTC1_16.10.10	Curvas de Resultados para RT-PCR 
Fecha entrada laboratorio:	19/10/2010	
Fecha purificación:	20/10/2010	
Fecha amplificación:	18/11/2010	
Técnico laboratorio:	S.O.A.	
Técnica analítica:	PCR a tiempo real. RT-PCR con los oligos ZM42 o ZM134 a 250nM y Master Mix de Roche conteniendo SYBR. Para la determinación de los niveles de 18S se utilizaron sondas Taqman y Master Mix de Roche para sondas.	

E1679-01 RESULTADO

Negativo (contraste óptico negativo)