CLASIFICACIÓN DE LA INFORMACIÓN					
Pública	x	Pública Clasificada		Pública Reservada	

PROCESO DE GESTIÓN CONTRACTUAL
FORMATO INFORME DE SUPERVISIÓN

1. ASPECTOS GENERALES

CONTRATANTE	REGIONAL CUNDINAMARCA – CENTRO DE BIOTECNOLOGIA AGROPECUARIA
CONTRATO NRO.	No CO1.PCCNTR.6998654 de 2024
FECHA DE SUSCRIPCIÓN	6 de noviembre de 2024
OBJETO	“PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS, VACUNAS, ANÁLISIS QUÍMICOS DE ESPECIES ANIMALES Y ANÁLISIS BROMATOLÓGICO- ESPECIALIZADOS PARA EL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA SENA- MOSQUERA"
CONTRATISTA	ZOOLAB S.A.S.
CC o NIT	830085197-8
LUGAR DE EJECUCIÓN	Centro de Biotecnología Agropecuaria
FECHA DE INICIO	18/11/2024
PLAZO INICIAL DEL CONTRATO	45Días
VALOR INICIAL DEL CONTRATO	Cuarenta millones de pesos M/CTE. ($ 40.000.000)
PRÓRROGA NRO.	N/A
FECHA DE TERMINACIÓN	31/12/202
ADICIÓN NRO.	N/A
VALOR ACTUAL DEL CONTRATO	Cuarenta millones de pesos M/CTE. ($ 40.000.000)
FORMA DE PAGO	Pagos parciales
INFORME DE SUPERVISIÓN NRO.	No 1
PERIODO DEL INFORME	27/11/2024 al 12/12/2024

2. EJECUCIÓN CONTRACTUAL

OBLIGACIONES	ACTIVIDADES REALIZADAS	PRODUCTO O EVIDENCIA
Obligaciones Específicas del Contratista		
1. Ejecutar el objeto del contrato para el SENA, según los detalles, especificaciones y condiciones técnicas y de seguridad, libres de defectos e imperfecciones de acuerdo con los diferentes documentos que integran el proceso de contratación y las normas de calidad del producto.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte
2. Garantizar la ejecución del objeto del contrato en los plazos establecidos, bajo las condiciones técnicas, económicas y jurídicas estipuladas en los documentos que integran el proceso de contratación y de acuerdo con la propuesta aceptada por la entidad.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte
3. Garantizar la entrega de productos amigables con el medio ambiente, según lo establecido en el numeral 4 del Manual de Contratación administrativa del SENA. 7 GCCON-F-046 V.02	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte

4. El contratista entregará los análisis en las instalaciones del Centro de Biotecnología Agropecuaria ubicada en el Km 7 vía Mosquera, con los protocolos de bioseguridad necesarios, bajo los lineamientos establecidos por el Gobierno Nacional.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa informe
5. El contratista reemplazará en un término máximo de tres (3) días calendario, todos los ítems, que NO cumplan con los requisitos exigidos de acuerdo con el informe del supervisor del contrato.	N/A	N/A
6. El transporte para efectuar la ejecución del contrato debe ser cubierta por el contratista.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte
7. Suministrar al supervisor del contrato toda la información que le sea solicitada para verificar el correcto y oportuno cumplimiento de las obligaciones que contrae, de acuerdo con los art. 4º y 5º de la Ley 80 de 1993.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA.

8. Informar al SENA dentro de las veinticuatro (24) horas siguientes al conocimiento del hecho o circunstancias que puedan incidir en la no oportuna o debida ejecución del contrato o que puedan poner en peligro los intereses legítimos del SENA.	Sin novedad	Sin novedad
9. El riesgo y propiedad de los bienes a utilizar dentro de la prestación del servicio serán asumidos por parte del PROPONENTE. El SENA no suministrará ningún tipo de elemento, equipo o personal para la prestación del servicio.	N/A	N/A
10. Los insumos utilizados para cada análisis deben ser de primera calidad.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA.
11. Disponer durante la ejecución del contrato del equipo humano y personal necesario, idóneo y suficiente para la óptima ejecución de este y conforme a lo requerido por la Entidad.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA.

12. Informar al SENA cualquier novedad que se presente con la ejecución del contrato para efectos de que se asuma las medidas necesarias.	Sin novedad	Sin novedad
13. En cumplimiento de los dispuesto en el parágrafo del artículo 23 de la Ley 1150 de 2007 el contratista deberá acreditar que se encuentra al día en el pago mensual de los aportes al sistema de seguridad social (salud, pensión y riesgos profesionales) a partir del día del perfeccionamiento del contrato y para la realización de cada pago derivado del mismo, estos pagos se acreditan únicamente por el sistema de planilla asistida o el que determine el ministerio cuando corresponda.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte

14. De ninguna manera se podrá cambiar en forma unilateral las obligaciones ni las especificaciones técnicas de los Ítems requeridos, como tampoco atender solicitudes de cambios frente a los mismos de persona distinta a la designada para ejercer la SUPERVISIÓN del contrato.	N/A	N/A
OBLIGACIONES CONTRACTUALES REQUISITOS SIGA LOTE 1		
• Presentar certificados de afiliación vigente de Seguridad Social no mayor a 30 días.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte
• Presentar copia de los pagos de seguridad social, donde se evidencie la cotización al nivel de riesgo acorde a la actividad desarrollada.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte
• El proponente deberá presentar copia del registro ICA de los medicamentos veterinarios a adquirir.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte
• El proveedor se deberá asegurar que los medicamentos suministrados al SENA no presenten vencimientos	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte

• El proveedor deberá allegar ficha técnica de los medicamentos veterinarios como productos terminados y/o aditivos empleados en la elaboración de alimentos para animales, con el objetivo de soportar que se encuentran libres del ingrediente arsénico o compuestos arsenicales. Se prohíbe la adquisición de alimentos o medicamentos veterinarios que declaren contener como ingrediente el arsénico.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte
• Es obligatorio vacunar a todos los porcinos contra la Peste Porcina Clásica.	N/A	N/A

• PPC en las zonas establecidas mediante el siguiente esquema de vacunación: -Los lechones recibirán la primera vacunación entre los 45 y 60 días de edad. -Las cerdas de reemplazo se revacunarán a los 4 o 5 meses de edad. -Las cerdas de cría se vacunarán semestralmente después de los 90 días de gestación o en la primera semana de lactancia. -Los machos reproductores se revacunarán semestralmente. -Las hembras y machos de reproducción se identificarán con la chapeta oficial al inicio de su ciclo productivo y se conservará la misma durante los siguientes ciclos de vacunación. NOTA: Las zonas de obligatoria implementación se podrá validar en el artículo 2 de la Resolución 27077 de 2018. "	N/A	N/A

• Para la vacuna de brucelosis bovina se deberá verificar: -Para garantizar la eficacia se deberá conservar la temperatura entre los 2 y 8 grados centígrados durante el transporte y almacenamiento. - Deberá transportarse en neveras portátiles que garanticen temperaturas internas de 2 a 8 grados centígrados. Dichas neveras deberán contener suficientes paquetes refrigerantes. - La vacuna nunca debe estar congelada. -Se deberá validar que las vacunas se encuentren bien empacadas con el fin de que no tengan contacto con ningún factor externo (incluido los paquetes refrigerantes). -La vacuna no deberá transportar ningún otro tipo de vacuna, medicamento o insumo. -El vacunador deberá recibir los frascos, jeringas y agujas usados durante la vacunación, con el fin de que gestione su adecuada disposición.	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte

• Entregar certificados de tratamiento, aprovechamiento o disposición final, máximo 3 meses después de recogidos los residuos, indicando las corrientes de los residuos, fecha, sitio de recolección y las cantidades en kilogramos	El contratista cumple	Centro de biotecnología Agropecuaria SENA. Se anexa soporte

3. AVANCE FINANCIERO DEL CONTRATO

FECHA DEL INFORME	NRO. DE FACTURA	VALOR FACTURADO	VALOR EJECUTADO	SALDO DEL CONTRATO	PORCENTAJE DE EJECUCIÓN FINANCIERA
12/12/2024	**1ZB No69828**	**$ 14.705.600**	**$14.705.600**	**$ 25.294.400**	**37%**
02/05/2025	**1zb No70202**	**$ 10.819.146**		**$ 14.475.254**	**64%**

4. RELACIÓN DE PAGOS DE SEGURIDAD SOCIAL

SALUD, PENSIÓN Y ARL	**Periodo reportado** Periodo salud 2024-11 Periodo pensiones 2024-10	**Planilla Nro.** 81736114 del 02 de diciembre de 2024

5. JUSTIFICACIÓN PARA LA MODIFICACIÓN

"No aplica"

5.1 Garantías contractuales

GARANTÍA ÚNICA DE CUMPLIMIENTO		
ASEGURADORA	MUNDIAL DE SEGUROS	
NRO. DE PÓLIZA	NB-100355868	
CERTIFICADO O ANEXO	0	
FECHA EXPEDICIÓN	15 DE NOVIEMBRE DE 2024	
FECHA APROBACIÓN	18 DE NOVIEMBRE DE 2024	
AMPARO	**VIGENCIA**	**VALOR**

	DESDE	HASTA	
Cumplimiento	12 DE NOVIEMBRE DE 2024	27 DE ABRIL DE 2024	$ 8.000.000
Devolución del pago anticipado	N/A	N/A	N/A
Salarios y prestaciones sociales	N/A	N/A	N/A
Calidad del servicio	12 DE NOVIEMBRE DE 2024	27 DE ABRIL DE 2024	$ 8.000.000

5.2 Multas y sanciones

A la fecha de presentación del presente informe, se certifica como supervisor del contrato y de acuerdo con la información reportada por la interventoría del contrato No CO1.PCCNTR.6998654 de 2024 que no se han presentado multas, indemnizaciones, reintegros ni sanciones.

5.3 CERTIFICACIÓN

Con la firma del presente informe, en mi calidad de supervisor(a), previa revisión de los documentos en la plataforma SECOP II, certifico el cumplimiento a cabalidad de las obligaciones establecidas en el contrato por parte del contratista y la plena autonomía en desarrollo de sus actividades durante el respectivo periodo. Con base en lo anterior, autorizo el pago conforme lo pactado contractualmente.

6. OBSERVACIONES

Sin observaciones.



ÁLVARO HUGO JARAMILLO BENAVIDES
SUPERVISOR DEL CONTRATO No CO1.PCCNTR.6998654 de 2024

Elaboró: Leonardo Bojaca Silva

PROCESO DE GESTIÓN CONTRACTUAL

ETAPA CONTRACTUAL

FORMATO
ANEXO AL CONTRATO DE COMPRAVENTA
No. CO1.PCCNTR.6998654 DE 2024
CELEBRADO ENTRE EL SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE - SENA
Y ZOOLAB S.A.S

OBJETO: PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS, VACUNAS, ANÁLISIS QUÍMICOS DE ESPECIES ANIMALES Y ANÁLISIS BROMATOLÓGICO-ESPECIALIZADOS PARA EL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA SENA- MOSQUERA"

FORMA DE PAGO:

El Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, pagará al CONTRATISTA, en PAGOS PARCIALES, de acuerdo con las actividades realizadas, previa presentación de factura y/o cuenta de cobro, y certificación de la Supervisión de haber recibido el servicio a satisfacción, la presentación de los documentos idóneos que acrediten el cumplimiento del pago a los sistemas de seguridad social en salud y pensión y demás requisitos solicitados para pago en la plataforma SECOP II, De esta manera no existirá riesgo alguno desde el punto de vista financiero que pueda afectar la ejecución y cumplimiento del contrato.

El desembolso antes señalado se realizará con sujeción al derecho de turno y al proceso que se desarrolla en la tesorería para tal fin, de tal manera que el SENA no asume responsabilidad alguna por la demora que pueda presentarse en dicho pago y por tanto el contratista cumplirá con sus obligaciones y no podrá aducir como justificación alguna para su no realización, y/o demora en el pago. En el valor pactado se entenderá incluido entre otros; gastos de administración, almacenamiento, herramientas y toda clase de equipos necesarios, la totalidad de los tributos originados por su celebración y ejecución y liquidación del contrato, las deducciones a que haya lugar, la remuneración para e contratista y en general todos los costos en que deba incurrir el contratista para la cumplida ejecución del contrato.

El SENA no reconocerá, por consiguiente, ningún reajuste realizado por el contratista en relación con todos los costos, gastos o actividades adicionales que aquel requiera para la ejecución del contrato y que fueron previsibles momento de la presentación de la propuesta.

Nota 1: En caso de que el proveedor se encuentra obligado a facturar electrónicamente deberá aportar factura electrónica de acuerdo con lo establecido por la DIAN, el cual será un requisito para el pago del respectivo contrato. Todas las facturas electrónicas para su reconocimiento tributario deberán ser validadas previo a su expedición, por la Dirección de Impuestos y Aduanas Nacionales (DIAN) o por un proveedor autorizado por esta. La factura electrónica solo se entenderá expedida cuando sea validada por el proveedor autorizado.

Nota 2: factura electrónica sin validación previa, en estos casos, la factura se entenderá expedida con la entrega al adquiriente y deberá ser enviada a la Dirección de Impuestos y Aduanas Nacionales (DIAN) o proveedor autorizado para su validación dentro de las 48 horas siguientes. Contadas a partir del momento en que se solucionen los problemas tecnológicos.

Nota 3: IMPROCEDENCIA DE RECONOCIMIENTO DE FÓRMULA DE REAJUSTE: El contratista se obliga a mantener los precios ofertados en la propuesta y entiende y acepta que los mismos n estarán sujetos a reajuste alguno (ni por cambio de vigencia) durante el término de ejecución del contrato y hasta su liquidación inclusive.

Las demoras ocasionadas porque la factura no haya sido bien elaborada o no se adjunten los documentos que se solicitan en los términos anteriores no serán atribuibles a la Entidad.

OBLIGACIONES:

Obligaciones Generales del Contratista:

1. Desarrollar el objeto contractual en condiciones de eficiencia, oportunidad y calidad de conformidad a los parámetros establecidos por el SENA. **2.** Constituir dentro de los tres (3) días hábiles siguientes a la suscripción del contrato la garantía única establecida en el presente documento, dicho requerimiento se aplicará también para adiciones, prorrogas, modificaciones, suspensiones y demás documentos que puedan alterar el negocio jurídico que se origine. **3.** Cumplir con idoneidad y eficacia el objeto del contrato y su alcance. **4.** Dar estricto cumplimiento a los términos pactados en el contrato y por ningún motivo abandonar el efectivo cumplimiento del objeto del contrato. **5.** No acceder a peticiones o amenazas de quienes actúen por fuera de la Ley con el fin de obligarlos a hacer u omitir algún acto o hecho propio de sus obligaciones, debiendo informar inmediatamente al SENA, a través del funcionario responsable del control de ejecución acerca de la ocurrencia de tales peticiones o amenazas y a las demás autoridades competentes para que se adopten las medidas y correctivos que fueren necesarios. **6.**Obrar con lealtad y buena fe en las distintas etapas contractuales, evitando todo tipo de dilaciones o retrasos que pudieran presentarse. **7.** Responder por el cumplimiento de las obligaciones fiscales y tributarias que se deriven del contrato celebrado en los términos de ley. **8.** Reportar de manera inmediata al SENA, a través del supervisor

designado, cualquier novedad, anomalía o situación irregular que se presente que pueda afectar la correcta ejecución. **9.** Realizar las entregas de los equipos y máquinas, de conformidad con los parámetros y lugar indicados en la propuesta. **10.** Garantizar que los materiales y elementos suministrados en desarrollo del contrato, sean de primera calidad y deberán cumplir con las especificaciones técnicas y condiciones económicas y financieras requeridas. **11.** Entregar los informes específicos o extraordinarios referidos a la ejecución, cuando le sean solicitados por parte de quien ejerce el control y vigilancia del contrato. **12.** Dar aviso al SENA dentro de las veinticuatro (24) horas siguientes al conocimiento del hecho o circunstancias que puedan incidir en la no oportuna o debida ejecución del contrato o que puedan poner en peligro los intereses legítimos del SENA. **13.** Vincular al personal y celebrar subcontratos en su propio nombre y por su propia cuenta y riesgo, sin que el SENA adquiera responsabilidad, ni solidaridad alguna por dichos actos. Por lo anterior, deberá asumir respecto de sus subcontratistas (personal dirigido a la ejecución del contrato) los honorarios o salarios, horas extras. Dominicales y festivos, recargo nocturno, indemnizaciones y demás prestaciones, afiliaciones al sistema de pensiones y salud, según lo ordenado por la Ley 100 de 1993 y Ley 1562 de 2012 que se causen durante la ejecución del contrato, atendiendo a la modalidad de vinculación que aplique con las personas que subcontrate. **14.** Dar cumplimiento a las obligaciones con los sistemas de seguridad social, (salud, pensiones y riesgos laborales), así como el SG-SST y demás normas aplicables, y presentar los documentos respectivos que así lo acrediten, en especial autoevaluación de estándares mínimos que le corresponda de acuerdo con número de trabajadores y nivel de riesgo. Aquellas que tengan un puntaje igual o inferior a 85% deberán entregar el respectivo plan de mejoramiento, de conformidad con lo establecido en la Resolución 312 de 2019 y certificación firmada por el representante legal y el responsable de Seguridad y Salud en el Trabajo o certificación de ARL, en donde conste la implementación y mantenimiento del SG-SST de acuerdo con lo establecido en el Decreto 1072 de 2015 y la Resolución 0312 de 2019, cuando se trate de una persona natural este requisito no es obligatorio. **15.** Pagar los salarios, prestaciones sociales e indemnizaciones del personal que el contratista haya de emplear para la ejecución del negocio y presentar para el trámite de pagos, copia de la planilla de pago de los aportes al régimen de seguridad social, para el periodo cobrado. **16.** Guardar completa reserva sobre todos los datos que lleguen a su conocimiento y cuya divulgación pudiera causar perjuicios a la Entidad. **17.** Cumplir con los términos, condiciones y deberes de protección de datos personales de acuerdo con lo establecido en la Ley 1581 de 2012 y decretos reglamentarios, así como las normas que las modifiquen, aclaren, complementen o sustituyan. **18.** Responder ante las autoridades competentes por los actos u omisiones que ejecute en desarrollo del contrato, cuando en ellos se cause perjuicio a la entidad o a terceros en los términos del artículo 52 de la Ley 80 de 1993. **19.** Mantener vigentes las garantías otorgadas durante la ejecución del contrato celebrado. **20.** Desempeñar las demás actividades que sean necesarias para lograr un total y adecuado cumplimiento de sus obligaciones, aunque no estén específicamente señaladas y que sean de la naturaleza del contrato celebrado. **21.**Suscribir oportunamente el acta de liquidación de la aceptación de oferta y las modificaciones si las hubiere. **22.** Dar cumplimiento de las obligaciones que le aplican

de conformidad con los artículos 2.2.4.1.3, 2.2.4.6.1, 2.2.4.6.4 y 2.2.4.6.8 del Decreto 1072 de 2015 y la Resolución 0312 de 2019. **23.** En caso de que el proveedor se encuentra obligado a facturar electrónicamente deberá aportar factura electrónica de acuerdo con lo establecido por la DIAN, el cual será un requisito para el pago del respectivo contrato. Todas las facturas electrónicas para su reconocimiento tributario deberán ser validadas previo a su expedición, por la Dirección de Impuestos y Aduanas Nacionales (DIAN) o por un proveedor autorizado por esta. La factura electrónica solo se entenderá expedida cuando sea validada por el proveedor autorizado. PARÁGRAFO: factura electrónica sin validación previa, en estos casos, la factura se entenderá expedida con la entrega al adquiriente y deberá ser enviada a la Dirección de Impuestos y Aduanas Nacionales (DIAN) o proveedor autorizado para su validación dentro de las 48 horas siguientes. Contadas a partir del momento en que se solucionen los problemas tecnológicos. **24.** Asumir todas aquellas obligaciones inherentes al contrato y necesarias para la correcta ejecución del objeto de este. **25.** Las demás relacionadas con el objeto del contrato y las que por su naturaleza tengan relación directa con el mismo.

Obligaciones Específicas del Contratista:

1. Ejecutar el objeto del contrato para el SENA, según los detalles, especificaciones y condiciones técnicas y de seguridad, libres de defectos e imperfecciones de acuerdo con los diferentes documentos que integran el proceso de contratación y las normas de calidad del producto. 2. Garantizar la ejecución del objeto del contrato en los plazos establecidos, bajo las condiciones técnicas, económicas y jurídicas estipuladas en los documentos que integran el proceso de contratación y de acuerdo con la propuesta aceptada por la entidad. 3. Garantizar la entrega de productos amigables con el medio ambiente, según lo establecido en el numeral 4 del Manual de Contratación administrativa del SENA. 7 GCCON-F-046 V.02 4. El contratista entregará los análisis en las instalaciones del Centro de Biotecnología Agropecuaria ubicada en el Km 7 vía Mosquera, con los protocolos de bioseguridad necesarios, bajo los lineamientos establecidos por el Gobierno Nacional. 5. El contratista reemplazará en un término máximo de tres (3) días calendario, todos los ítems, que NO cumplan con los requisitos exigidos de acuerdo con el informe del supervisor del contrato. 6. El transporte para efectuar la ejecución del contrato debe ser cubierta por el contratista. 7. Suministrar al supervisor del contrato toda la información que le sea solicitada para verificar el correcto y oportuno cumplimiento de las obligaciones que contrae, de acuerdo con los art. 4º y 5º de la Ley 80 de 1993. 8. Informar al SENA dentro de las veinticuatro (24) horas siguientes al conocimiento del hecho o circunstancias que puedan incidir en la no oportuna o debida ejecución del contrato o que puedan poner en peligro los intereses legítimos del SENA. 9. El riesgo y propiedad de los bienes a utilizar dentro de la prestación del servicio serán asumidos por parte del PROPONENTE. El SENA no suministrará ningún tipo de elemento, equipo o personal para la prestación del servicio. 10. Los insumos utilizados para cada análisis deben ser de primera calidad. 11. Disponer durante la ejecución del contrato del equipo humano y personal necesario, idóneo y suficiente para la óptima

ejecución de este y conforme a lo requerido por la Entidad. 12. Informar al SENA cualquier novedad que se presente con la ejecución del contrato para efectos de que se asuma las medidas necesarias. 13. En cumplimiento de los dispuesto en el parágrafo del artículo 23 de la Ley 1150 de 2007 el contratista deberá acreditar que se encuentra al día en el pago mensual de los aportes al sistema de seguridad social (salud, pensión y riesgos profesionales) a partir del día del perfeccionamiento del contrato y para la realización de cada pago derivado del mismo, estos pagos se acreditan únicamente por el sistema de planilla asistida o el que determine el ministerio cuando corresponda. 14. De ninguna manera se podrá cambiar en forma unilateral las obligaciones ni las especificaciones técnicas de los Ítems requeridos, como tampoco atender solicitudes de cambios frente a los mismos de persona distinta a la designada para ejercer la SUPERVISIÓN del contrato.

OBLIGACIONES CONTRACTUALES REQUISITOS SIGA

LOTE 1.

•Presentar certificados de afiliación vigente de Seguridad Social no mayor a 30 días. •Presentar copia de los pagos de seguridad social, donde se evidencie la cotización al nivel de riesgo acorde a la actividad desarrollada. * El proponente deberápresentar copia del registro ICA de los medicamentos veterinarios a adquirir. * El proveedor se deberá asegurar que los medicamentos suministrados al SENA no presenten vencimientos * El proveedor deberá allegar ficha técnica de los medicamentos veterinarios como productos terminados y/o aditivos empleados en la elaboración de alimentos para animales, con el objetivo de soportar que se encuentran libres del ingrediente arsénico o compuestos arsenicales. Se prohíbe la adquisición de alimentos o medicamentos veterinarios que declaren contener como ingrediente el arsénico. * "Es obligatorio vacunar a todos los porcinos contra la Peste Porcina Clásica. - PPC en las zonas establecidas mediante el siguiente esquema de vacunación: -Los lechones recibirán la primera vacunación entre los 45 y 60 días de edad. -Las cerdas de reemplazo se revacunarán a los 4 o 5 meses de edad. -Las cerdas de cría se vacunarán semestralmente después de los 90 días de gestación o en la primera semana de lactancia. -Los machos reproductores se revacunarán semestralmente. -Las hembras y machos de reproducción se identificarán con la chapeta oficial al inicio de su ciclo productivo y se conservará la misma durante los siguientes ciclos de vacunación. NOTA: Las zonas de obligatoria implementación se podrá validar en el artículo 2 de la Resolución 27077 de 2018. " • Para la vacuna de brucelosis bovina se deberá verificar: -Para garantizar la eficacia se deberá conservar la temperatura entre los 2 y 8 grados centígrados durante el transporte y almacenamiento. -Deberá transportarse en neveras portátiles que garanticen temperaturas internas de 2 a 8 grados centígrados. Dichas neveras deberán contener suficientes paquetes refrigerantes. -La vacuna nunca debe estar congelada. -Se deberá validar que las vacunas se encuentren bien empacadas con el fin de que no tengan contacto con ningún factor externo (incluido los paquetes refrigerantes). -La

vacuna no deberá transportar ningún otro tipo de vacuna, medicamento o insumo. -El vacunador deberá recibir los frascos, jeringas y agujas usados durante la vacunación, con el fin de que gestione su adecuada disposición. • Entregar certificados de tratamiento, aprovechamiento o disposición final, máximo 3 meses después de recogidos los residuos, indicando las corrientes de los residuos, fecha, sitio de recolección y las cantidades en kilogramos.

LOTE 2.

•Presentar certificados de afiliación vigente de Seguridad Social no mayor a 30 días. •Presentar copia de los pagos de seguridad social, donde se evidencie la cotización al nivel de riesgo acorde a la actividad desarrollada. • El proponente deberá presentar certificado de la ONAC como acreditado para ensayos de laboratorio.

OBLIGACIONES DEL SENA:

1. Verificar previo a la suscripción del contrato, los documentos requeridos para la contratación. **2.** Suministrar oportunamente la información que se requiera para el cumplimiento de las obligaciones contractuales. **3.** Poner disposición del contratista, la información y/o documentación requerida para la ejecución del contrato. **4.** Suscribir juntamente con el CONTRATISTA las actas y los demás documentos necesarios para la ejecución y liquidación de este contrato. **5.** Verificar que el contratista presente el pago a las obligaciones del Sistema de Seguridad Social y parafiscales. **6.** Realizar el seguimiento o supervisión del cumplimiento del objeto contractual. **7.** Pagar la contraprestación a la que tiene derecho el CONTRATISTA.

MULTAS: En virtud de lo establecido en el artículo 40 de la Ley 80 de 1993, las partes acuerdan que en caso de retardo previamente verificado por el o los supervisores en el cumplimiento de cualquiera de las obligaciones señaladas en el contrato a cargo del **CONTRATISTA** y como apremio para que las atienda oportunamente, el **CONTRATISTA** pagará a favor del SENA multas equivalentes hasta por el dos (2%) del valor del contrato por cada día de atraso en el cumplimiento de sus obligaciones, sin que el valor total de ellas pueda llegar a exceder el diez por ciento (10%) del valor total del mismo, para tal efecto se dará aplicación al artículo 86 de la Ley 1474 de 2011. **CLÁUSULA PENAL PECUNIARIA:** Si **EL CONTRATISTA** no diere cumplimiento en forma total o parcial al objeto o a las obligaciones emanadas del contrato, pagará al **SENA** hasta el diez por ciento (10%) del valor total del mismo, como estimación anticipada de perjuicios, sin que lo anterior sea óbice para que se realice la reclamación de los perjuicios a que haya lugar, para tal efecto se dará aplicación al artículo 86 de la Ley 1474 de 2011. **INHABILIDADES E INCOMPATIBILIDADES:** el **CONTRATISTA** declara bajo la gravedad del juramento, que se entiende prestado con la presentación de la propuesta y con la firma del contrato, que ni él, ni las personas que representa se halla incurso en alguna de las causales de inhabilidad e incompatibilidad señaladas en el artículo 8 de

la Ley 80 de 1993, articulo 90 de la Ley 1474 de 2011 y demás normas concordantes. **PARÁGRAFO PRIMERO:** Si llegare a sobrevenir inhabilidad o incompatibilidad por parte del **CONTRATISTA**, éste cederá el contrato previa autorización escrita del **SENA** a través de la supervisión y si ello no fuere posible el **CONTRATISTA** renunciará a su ejecución. **PARÁGRAFO SEGUNDO:** Presentada la causal de inhabilidad o incompatibilidad, el **CONTRATISTA** deberá informar al **SENA** dentro de los tres (3) días hábiles siguientes a su acontecimiento y podrá proponer un candidato, quien deberá manifestar por escrito que se encuentra dispuesto a continuar con la ejecución del contrato en las mismas condiciones pactadas con el primer Contratista. **EL SENA** se reserva la facultad de aceptar al candidato propuesto por el **CONTRATISTA** o en su defecto autorizar la cesión a favor de un tercero que reúna las condiciones para continuar con la ejecución del contrato. **INDEMNIDAD DEL SENA:** el **CONTRATISTA**, mantendrá indemne al SENA contra todo reclamo, demanda, acción legal, y costos que puedan causarse o surgir por daños o lesiones a personas o bienes, ocasionados por EL **CONTRATISTA** o su personal, durante la ejecución del objeto y obligaciones del contrato. En caso de que se formule reclamo, demanda o acción legal contra el **SENA** por asuntos, que según el contrato sean de responsabilidad del **CONTRATISTA**, se le comunicará lo más pronto posible de ello para que por su cuenta adopte oportunamente las medidas previstas por la ley para mantener indemne al **SENA** y adelante los trámites para llegar a un arreglo del conflicto. **EL SENA,** a solicitud del **CONTRATISTA**, podrá prestar su colaboración para atender los reclamos legales y el contratista a su vez reconocerá los costos que éstos ocasionen al **SENA,** sin que la responsabilidad de **EL CONTRATISTA** se atenúe por este reconocimiento, ni por el hecho de que el **SENA** en un momento haya prestado su colaboración para atender a la defensa de sus intereses contra tales reclamos, demandas o acciones legales. Si en cualquiera de los eventos previstos en este numeral **EL CONTRATISTA** no asume debida y oportunamente la defensa del **SENA** éste podrá hacerlo directamente, previa comunicación escrita al **CONTRATISTA**, quien pagará todos los gastos que el **SENA** incurra por tal motivo. En caso de que así no lo hiciera el **CONTRATISTA**, el **SENA** tendrá derecho a descontar el valor de tales erogaciones de cualquier suma que adeude EL CONTRATISTA. **GASTOS E IMPUESTOS:** Serán por cuenta del **CONTRATISTA** todos los gastos e impuestos, tasas y contribuciones nacionales, departamentales y municipales derivados de la celebración, ejecución y liquidación del contrato, así como el valor de la prima de la garantía única y sus modificaciones**. SOLUCIÓN DIRECTA DE CONTROVERSIAS CONTRACTUALES:** Las partes en aras de solucionar en forma ágil, rápida y directa las diferencias y discrepancias surgidas en la ejecución del contrato, acudirán a los mecanismos de solución previstos en la Ley, tales como la conciliación, amigable composición y transacción. **CESIÓN Y SUBCONTRATOS:** El **CONTRATISTA**, no podrá ceder ni subcontratar el respectivo contrato sin el consentimiento previo y escrito del **SENA** pudiendo éste negar la autorización de la cesión o del subcontrato. DE LA INTERPRETACIÓN UNILATERAL, MODIFICACIÓN UNILATERAL, **TERMINACIÓN UNILATERAL Y CADUCIDAD:** Este contrato se rige por las cláusulas excepcionales de interpretación unilateral, modificación unilateral, terminación unilateral

y caducidad, de que tratan los artículos 15, 16 y 17 de la ley 80 de 1993.

CAUSALES DE TERMINACIÓN: Este contrato se dará por terminado en cualquiera de los siguientes eventos: **a)** Anticipadamente por mutuo acuerdo de las partes, siempre que con ello no se causen perjuicios al **SENA**. **b)** Por agotamiento del objeto o vencimiento del plazo. **c)** Por fuerza mayor o caso fortuito que hagan imposible continuar su ejecución. **d)** Unilateralmente por incumplimiento del contratista. **PARÁGRAFO:** La terminación anticipada del contrato se hará constar en acta suscrita por las partes. **EXCLUSIÓN DE RELACIÓN LABORAL**: Teniendo en cuenta que **EL CONTRATISTA** actúa con plena autonomía técnica y administrativa, frente al **SENA**, se excluye cualquier vínculo de tipo laboral entre el **SENA** y **EL CONTRATISTA** o el personal utilizado por éste para el desarrollo del objeto del contrato. En consecuencia, será de exclusiva responsabilidad del contratista el pago de salarios y prestaciones a que hubiera lugar respecto del personal mencionado. **PROPIEDAD INTELECTUAL:** Si de la ejecución del presente contrato resultan estudios, investigaciones, descubrimientos, invenciones, información, mejoras y/o diseños, éstos pertenecen a EL SENA de conformidad con lo establecido en el artículo 20 de la Ley 23 de 1982 modificado por el artículo 28 de la Ley 1450 de 2011, y el artículo 21 de la misma Ley, que establece el término de protección, sin perjuicio del respeto al derecho moral consagrado en el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993 concordante con el artículo 30 de la Ley 23 de 1982. EL CONTRATISTA garantiza que los trabajos y servicios prestados al SENA por el objeto de este contrato no infringen ni vulneran los derechos de propiedad intelectual o industrial o cualesquiera otros derechos legales o contractuales de terceros. S**EGURIDAD DE LA INFORMACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD:** el CONTRATISTA se obliga a guardar estricta confidencialidad sobre toda la información sometida a reserva debidamente identificada como tal por EL SENA y conocida en virtud del desarrollo y ejecución del presente contrato. Esta obligación de confidencialidad se aplicará para todos los casos, salvo que la información confidencial sea requerida por autoridad competente. PARÁGRAFO. La presente cláusula de confidencialidad se mantendrá vigente mientras la información catalogada como tal conserve el carácter de reservada. En todo caso estará sujeta a la reglamentación sobre información confidencial de los artículos 260 a 266 de la Decisión 486 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena y lo Previsto en el artículo 1 de la Ley 1755 de 2015, respecto de la información y documentos reservados, artículo 24 sustituido, y en las demás normas concordantes y complementarias que regulen la materia. **DOCUMENTOS:** Los documentos que a continuación se relacionan, se considerarán para todos los efectos parte integrante del contrato y en consecuencia producen sus mismos efectos y obligaciones jurídicas y contractuales: **a)** El estudio previo, pliego electrónico, adendas y los demás documentos previos expedidos por el **SENA** en desarrollo del proceso**. b)** La propuesta del **CONTRATISTA** y los documentos adjuntos presentados con la misma. **c)** Las instrucciones escritas al **CONTRATISTA** para la ejecución de los trabajos. **d)** Las actas y demás documentos que durante la ejecución del contrato se suscriban por las partes.

PERFECCIONAMIENTO Y EJECUCIÓN: El presente contrato, se entenderá perfeccionado con la firma de las partes contratantes y para su legalización y ejecución requiere: **1)** Registro Presupuestal. **2)** Constitución de la garantía única en las condiciones señaladas en la cláusula octava del presente contrato por parte de EL CONTRATISTA y la aprobación de la misma por parte del **SENA**. **PARÁGRAFO:** El inicio de la ejecución estará condicionado, además, a los requisitos de inicio contemplados en el pliego de condiciones y/o estudio previo. **SUSPENSIÓN:** El plazo de ejecución del presente contrato podrá ser suspendido excepcionalmente de manera temporal, en las siguientes circunstancias: 1 Por el mutuo acuerdo de las partes. 2. Por causas debidamente justificadas, previa solicitud del CONTRATISTA. **PARÁGRAFO:** En caso de suspensión el (la) CONTRATISTA se obliga a informar tal evento al Asegurador y a ampliar las garantías, proporcionalmente al término que dure la misma. **RÉGIMEN LEGAL:** El contrato se regirá en general por las disposiciones comerciales y civiles pertinentes, salvo en los aspectos particularmente regulados por la Ley de contratación que le sean aplicables de conformidad con lo dispuesto en la Ley 80 de 1993, Ley 1150 de 2007, Decreto Reglamentario 1082 de 2015**.** **SUPERVISIÓN Y/O INTERVENTORÍA** La supervisión será ejercida a través del funcionario Jorge Esteban Amaya Camelo, con el apoyo del contratista Luis Eduardo Pinzón Galindo, quienes velaran por el cabal cumplimiento de todas y cada una de las actividades que se le encomienden al contratista, de conformidad con lo determinado por el Manual de Supervisión e Interventoría, Código GCCON-M-002.

Vobo: *Nelson Octavio Gómez Botero - subdirector de Centro*

Revisó: Sandra Milena Castaneda Hurtado - Coordinadora Administrativa y Financiera
Elaboró: Sergio Fabian Beltran Palacios – Abogado Centro de Formación

	Versión: 02
	Código: GCCON-F-072

PROCESO GESTION CONTRACTUAL

FORMATO ACTA APROBACIÓN DE GARANTÍAS

En cumplimiento de lo establecido en el Artículo **2.2.1.2.3.1.1.** del Decreto 1082 de 2015 ***"POR MEDIO DEL CUAL SE EXPIDE EL DECRETO ÚNICO REGLAMENTARIO DEL SECTOR ADMINISTRATIVO DE PLANEACIÓN NACIONAL"***, se procede a aprobar la garantía única de cumplimiento, según la siguiente información así:

NUMERO DEL CONTRATO Y FECHA:	**6998654 del 12 de Novimebre de 2024**		
OBJETO DEL CONTRATO:	PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS, VACUNAS, ANÁLISIS QUÍMICOS DE ESPECIES ANIMALES Y ANÁLISIS BROMATOLÓGICO- ESPECIALIZADOS" PARA EL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA SENA- MOSQUERA		
CONTRATISTA:	**ZOOLAB S.A.S**	**NIT / CC:**	**830085197**
VALOR INICIAL DEL CONTRATO :	40`000.000	**VALOR TOTAL:**	40`000.000
PLAZO INICIAL DEL CONTRATO:	45 DIAS		
MODIFICACIONES:	**N/A**		
GARANTÍA UNICA NUMERO :	NB-100355868		
TIPO DE GARANTÍA:	CUMPLIMIENTO - CALIDAD DE SERVICIO		
COMPAÑÍA ASEGURADORA:	MUNDIAL DE SEGUROS		
FECHA DE EXPEDICIÓN:	15 DE NOVIEMBRE DE 2024		

VERIFICACIÓN DE LOS AMPAROS

AMPARO	PORCENTAJE	VIGENCIA DEL AMPARO	FECHA DE INICIO (D/M/AA)	FECHA TERMINACIÓN (D/M/AA)	VALOR A ASEGURAR	VALOR ASEGURADO EN LA PÓLIZA
CUMPLIMIENTO	20%	EJECUCION DEL CONTRATO MAS 4 MESES	12 DE NOVIEMBRE DE 2024	27 DE ABRIL DE 2025	8`000.000	8`000.000
CALIDAD DEL SERVICIO	20%	EJECUCION DEL CONTRATO MAS 4 MESES	12 DE NOVIEMBRE DE 2024	27 DE ABRIL DE 2025	8`000.000	8`000.000

Verificados los amparos, valores y vigencias contenidas en la póliza de cumplimiento, esta se ajusta plenamente a lo requerido en el contrato y en consecuencia se imparte su aprobación en Mosquera, a los 18 de Noviembre de 2024

NELSON OCTAVIO GOMEZ BOTERO

SUBDIRECTOR

Vo. Bo. Sandra Milena Castañeda Hurtado - Coordinadora Administrativa

Proyecto Sergio Fabian Beltran Palacios - Abogado de Contratacion

seguros mundial®
tu compañía siempre

NIT 860.037.013-6
SOMOS GRANDES CONTRIBUYENTES
IVA REGIMEN COMÚN - AUTORETENEDORES

Código de Seguridad: WX9LOPJbkqGkeQ8xLMcahw==

COMPAÑÍA MUNDIAL DE SEGUROS S.A.
DIRECCIÓN GENERAL CALLE 33 N. 6B - 24 PISOS 1,2 Y 3 - BOGOTÁ
TELÉFONO: 2855600 FAX 2851220 - **WWW.SEGUROSMUNDIAL.COM.CO**

POLIZA DE SEGURO DE CUMPLIMIENTO

ENTIDADES ESTATALES DECRETO 1082

VERSIÓN CLAUSULADO 06-04-2021-1317-P-05-PPSUS2R000000059-D00I

No. PÓLIZA	NB-100355868	No. ANEXO	0	No. CERTIFICADO	72170170	No. RIESGO	
TIPO DE DOCUMENTO				FECHA DE EXPEDICIÓN	15/11/2024	SUC. EXPEDIDORA	BOGOTA

VIGENCIA DESDE		VIGENCIA HASTA		DÍAS	VIGENCIA DEL CERTIFICADO DESDE		VIGENCIA DEL CERTIFICADO HASTA	
00:00 Horas Del	12/11/2024	24:00 Horas Del	27/04/2025		N/A	N/A	N/A	N/A

TOMADOR	ZOOLAB S.A.S	**No. DOC. IDENTIDAD**	830.085.197-8
DIRECCIÓN	CR 73 #53 04	**TELÉFONO**	7044879
ASEGURADO	SENA REGIONAL CUNDINAMARCA GRUPO ADMINISTRATIVO CBA	**No. DOC. IDENTIDAD**	899.999.034-1
DIRECCIÓN	KM 7 VIA BOGOTA MOSQUERA MOSQUERA CUNDINAMARCA	**TELÉFONO**	6825505
BENEFICIARIO	SENA REGIONAL CUNDINAMARCA GRUPO ADMINISTRATIVO CBA	**No. DOC. IDENTIDAD**	899.999.034-1
DIRECCIÓN	KM 7 VIA BOGOTA MOSQUERA MOSQUERA CUNDINAMARCA	**TELÉFONO**	6825505

OBJETO DE CONTRATO

GARANTIZAR EL PAGO DE LOS PERJUICIOS DERIVADOS DEL INCUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTENIDAS EN EL CONTRATO DE PRESTACION DE SERVICIOS No.CO1.PCCNTR.6998654 , CUYO OBJETO ES

NUMERO DE CONTRATO CO1.PCCNTR.6998654
NUMERO DEL PROCESO MC-CMC-CBA-0019-2024_1
PRESTACION DE SERVICIOS DE PRUEBAS DIAGNOSTICAS, VACUNAS, ANALISIS QUIMICOS DE ESPECIES ANIMALES Y ANALISIS BROMATOLOGICO-ESPECIALIZADOS PARA EL CENTRO DE BIOTECNOLOGIA AGROPECUARIA SENA- MOSQUERA

NOMBRE DEL AMPARO	VIGENCIA DESDE	VIGENCIA HASTA	SUMA ASEGURADA$	VALOR PRIMA$
CUMPLIMIENTO	00:00 Horas Del 12/11/2024	24:00 Horas Del 27/04/2025	8.000.000,00	10.915,00
CALIDAD DEL SERVICIO	00:00 Horas Del 12/11/2024	24:00 Horas Del 27/04/2025	8.000.000,00	10.915,00
		TOTAL ASEGURADO	$ 16.000.000,00	

INTERMEDIARIOS	TIPO	% PARTICIPACIÓN
DELFUTURO SEGUROS LTDA	AGENCIAS	100,00

DISTRIBUCIÓN COASEGURO

COMPAÑÍA	TIPO COASEGURO	PÓLIZA LÍDER	CERTIF. LÍDER	% PARTICIPACIÓN

PRIMA BRUTA	$	21.830,00
DESCUENTOS	$	
EXTRA PRIMA		
PRIMA NETA	$	21.830,00
GASTOS EXP.	$	5.000,00
IVA	$	5.098,00
TOTAL A PAGAR	$	31.928,00

CONVENIO DE PAGO	DIRECTO EFECTIVO, Fecha de Pago: 15/11/2024

CONDICIONES GENERALES DE LA PÓLIZA

ES DE OBLIGATORIO CUMPLIMIENTO DILIGENCIAR EL FORMULARIO DE CONOCIMIENTO DEL CLIENTE, SUMINISTRAR INFORMACIÓN VERAZ Y VERIFICABLE Y REALIZAR ACTUALIZACIÓN DE DATOS POR LO MENOS ANUALMENTE (CIRCULAR EXTERNA 026 DE 2008 SUPERFINANCIERA).

CONSULTA LA AUTENTICIDAD DE ESTA POLIZA INGRESANDO A PRODUCTOS.MUNDIALSEGUROS.COM.CO, DIGITA EL NÚMERO DEL CERTIFICADO QUE ENCUENTRAS EN LA PARTE SUPERIOR DE ESTE DOCUMENTO Y VIVE LA EXPERIENCIA DE ESTAR ASEGURADO CON EL RESPALDO DE SEGUROS MUNDIAL. TAMBIEN PUEDES LLAMAR A LA LINEA NACIONAL **01 8000 111 935** O LÍNEA EN BOGOTÁ **327 47 12 / 13.**

EL TOMADOR Y/O ASEGURADO SEGÚN CORRESPONDA, SE COMPROMETE A PAGAR LA PRIMA DENTRO DE LOS 30 DÍAS CONTADOS A PARTIR DEL INICIO DE VIGENCIA DE LA PÓLIZA.
DE ACUERDO CON EL ARTÍCULO 1068 DEL CÓDIGO DE COMERCIO, MODIFICADO POR EL ARTÍCULO 82 DE LA LEY 45 DE 1990, **LA MORA EN EL PAGO DE LA PRIMA DE LA PRESENTE PÓLIZA O DE LOS CERTIFICADOS O ANEXOS QUE SE EXPIDAN CON FUNDAMENTO EN ELLA PRODUCIRÁ LA TERMINACIÓN AUTOMÁTICA DEL CONTRATO Y DARÁ DERECHO A LA COMPAÑÍA DE SEGUROS PARA EXIGIR EL PAGO DE LA PRIMA DEVENGADA Y DE LOS GASTOS CAUSADOS POR LA EXPEDICIÓN DE LA PÓLIZA.**
EN MI CALIDAD COMO TOMADOR DE LA PÓLIZA INDICADA EN ESTA CARATULA, MANIFIESTO EXPRESAMENTE QUE HE TENIDO A MI DISPOSICIÓN LAS CONDICIONES GENERALES DE LA PÓLIZA MANIFIESTO ADEMÁS, QUE DURANTE EL PROCESO DE NEGOCIACIÓN, ANTICIPADAMENTE ME HAN SIDO EXPLICADAS POR LA COMPAÑÍA Y/O POR EL INTERMEDIARIOS DE SEGUROS AQUÍ INDICADO, SOBRE LAS EXCLUSIONES Y ALCANCES Y CONTENIDOS DE LA COBERTURA, ASI COMO LAS GARANTÍAS, EN VIRTUD DE TAL ENTENDIMIENTO, LAS ACEPTO Y DECIDO TOMARLA PÓLIZA DE SEGUROS CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO.

Firma Autorizada - Compañía Mundial de Seguros S.A.
ANGELA MUNAR - VICEPRESIDENTE DE PRODUCTO
C.C. 52.646.070

TOMADOR

Lineas de Atención al Cliente:
- Nacional: **01 8000 111 935**
- Bogotá: **327 4712 - 327 4713**

VIGILADO SUPERINTENDENCIA FINANCIERA DE COLOMBIA

Cumplimos los sueños de nuestro planeta reciclando reponsablemente.
Protege el medio ambiente evitando la impresión de este documento.

AFILIADOS A LA CÁMARA COLOMBIANA DE LA INFRAESTRUCTURA Y PASA - APF

seguros mundial®

tu compañía siempre

NIT 860.037.013-6
SOMOS GRANDES CONTRIBUYENTES
IVA RÉGIMEN COMÚN - AUTORETENEDORES

COMPAÑÍA MUNDIAL DE SEGUROS S.A.
DIRECCIÓN GENERAL CALLE 33 N. 6B - 24 PISOS 1, 2 Y 3 - BOGOTÁ
TELÉFONO: 2855600 FAX 2851220 - **WWW.SEGUROSMUNDIAL.COM.CO**

POLIZA DE SEGURO DE CUMPLIMIENTO

ENTIDADES ESTATALES DECRETO 1082

VERSION CLAUSULADO 06-04-2021-1317-P-05-PPSUS2R000000059-D00I

No. PÓLIZA	NB-100355868	No. ANEXO	0	No. CERTIFICADO	72170170	No. RIESGO	
TIPO DE DOCUMENTO		FECHA DE EXPEDICIÓN	15/11/2024	SUC. EXPEDIDORA	BOGOTA		

VIGENCIA DESDE		VIGENCIA HASTA		DÍAS	VIGENCIA DEL CERTIFICADO DESDE		VIGENCIA DEL CERTIFICADO HASTA	
00:00 Horas Del	12/11/2024	24:00 Horas Del	27/04/2025		N/A	N/A	N/A	N/A

CONDICIONES PARTICULARES

"Con la emisión de la póliza se entiende que se autoriza a Seguros Mundial para que realice gestión de cobranza en caso de que aplique, a través de los siguientes canales: correo electrónico, llamada, SMS y WhatsApp. No obstante, en cualquier momento podrá solicitar la exclusión de alguno estos canales por medio de:
Página web: www.segurosmundial.com.co
Correo electrónico: mundial@segurosmundial.com.co
Líneas de atención: Bogotá (+601) 3274712 - (+601) 3274713 Nacional 018000111935"

VIGILADO SUPERINTENDENCIA FINANCIERA DE COLOMBIA

Cumplimos los sueños de nuestro planeta reciclando responsablemente.
Protege el Medio Ambiente evitando la impresión de este documento.

AFILIADOS A LA CÁMARA COLOMBIANA DE LA INFRAESTRUCTURA Y PASA - APF

seguros mundial®

tu compañía siempre

GARANTÍA ÚNICA DE CUMPLIMIENTO EN FAVOR DE ENTIDADES ESTATALES (DECRETO 1082 DE 2015)

1. RIESGOS AMPAROS

LA ASEGURADORA OTORGA A LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE ASEGURADA HASTA EL MONTO DEL VALOR ASEGURADO, LOS AMPAROS MENCIONADOS EN LA CARATULA DE LA PRESENTE PÓLIZA.

LOS AMPAROS DE LA PÓLIZA SERÁN INDEPENDIENTES UNOS DE OTROS RESPECTO DE SUS RIESGOS Y DE SUS VALORES ASEGURADOS. LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE ASEGURADA NO PODRÁ RECLAMAR O TOMAR EL VALOR DE UN AMPARO PARA CUBRIR O INDEMNIZAR EL VALOR DE OTROS. ESTOS NO SON ACUMULABLES Y SON EXCLUYENTES ENTRE SI, SEGÚN LAS DEFINICIONES Y ALCANCE QUE A CONTINUACIÓN SE ESTIPULAN:

1.1 AMPARO DE SERIEDAD DE LA OFERTA

LA GARANTÍA DE SERIEDAD DE LA OFERTA CUBRE LA SANCIÓN DERIVADA DEL INCUMPLIMIENTO DE LA OFERTA, EN LOS SIGUIENTES EVENTOS:

1.1.1 LA NO AMPLIACIÓN DE LA VIGENCIA DE LA GARANTÍA DE SERIEDAD DE LA OFERTA CUANDO EL PLAZO PARA LA ADJUDICACIÓN O PARA SUSCRIBIR EL CONTRATO ES PRORROGADO, SIEMPRE QUE TAL PRÓRROGA SEA INFERIOR A TRES (3) MESES.

1.1.2 EL RETIRO DE LA OFERTA DESPUÉS DE VENCIDO EL PLAZO FIJADO PARA LA PRESENTACIÓN DE LAS OFERTAS.

1.1.3 LA NO SUSCRIPCIÓN DEL CONTRATO SIN JUSTA CAUSA POR PARTE DEL ADJUDICATARIO.

1.1.4 LA FALTA DE OTORGAMIENTO POR PARTE DEL PROPONENTE SELECCIONADO DE LA GARANTÍA DE CUMPLIMIENTO DEL CONTRATO.

1.2 AMPARO DE BUEN MANEJO Y CORRECTA INVERSIÓN DEL ANTICIPO.

ESTE AMPARO CUBRE LOS PERJUICIOS SUFRIDOS POR LA ENTIDAD ESTATAL CON OCASIÓN DE:
(I) LA NO INVERSIÓN DEL ANTICIPO;
(II) EL USO INDEBIDO DEL ANTICIPO; Y
(III) LA APROPIACIÓN INDEBIDA DE LOS RECURSOS RECIBIDOS EN CALIDAD DE ANTICIPO.

1.3 AMPARO DE DEVOLUCIÓN DE PAGO ANTICIPADO

ESTE AMPARO CUBRE LOS PERJUICIOS SUFRIDOS POR LA ENTIDAD ESTATAL POR LA NO DEVOLUCIÓN TOTAL O PARCIAL DEL DINERO ENTREGADO AL CONTRATISTA A TÍTULO DE PAGO ANTICIPADO, CUANDO A ELLO HUBIERE LUGAR.

06/04/2021 -1317-P-05-PPSUS2R000000059-D00I
06/04/2021-1317-NT-P-05-NTPSUS2R00000060

1.4 AMPARO DE CUMPLIMIENTO DEL CONTRATO

ESTE AMPARO CUBRE A LA ENTIDAD ESTATAL DE LOS PERJUICIOS DERIVADOS DE: (A) EL INCUMPLIMIENTO TOTAL O PARCIAL DEL CONTRATO, CUANDO EL INCUMPLIMIENTO ES IMPUTABLE AL CONTRATISTA; (B) EL CUMPLIMIENTO TARDÍO O DEFECTUOSO DEL CONTRATO, CUANDO EL INCUMPLIMIENTO ES IMPUTABLE AL CONTRATISTA; (C) LOS DAÑOS IMPUTABLES AL CONTRATISTA POR ENTREGAS PARCIALES DE LA OBRA, CUANDO EL CONTRATO NO PREVÉ ENTREGAS PARCIALES; Y (D) EL PAGO DEL VALOR DE LAS MULTAS Y DE LA CLÁUSULA PENAL PECUNIARIA.

1.5 AMPARO DE SALARIOS, PRESTACIONES SOCIALES LEGALES E INDEMNIZACIONES LABORALES

ESTE AMPARO DEBE CUBRIR A LA ENTIDAD ESTATAL DE LOS PERJUICIOS OCASIONADOS POR EL INCUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES LABORALES DEL CONTRATISTA DERIVADAS DE LA CONTRATACIÓN DEL PERSONAL UTILIZADO EN EL TERRITORIO NACIONAL PARA LA EJECUCIÓN DEL CONTRATO AMPARADO.

LA ENTIDAD ESTATAL NO DEBE EXIGIR UNA GARANTÍA PARA CUBRIR ESTE RIESGO EN LOS CONTRATOS QUE SE EJECUTEN FUERA DEL TERRITORIO NACIONAL CON PERSONAL CONTRATADO BAJO UN RÉGIMEN JURÍDICO DISTINTO AL COLOMBIANO.

1.6 AMPARO DE ESTABILIDAD Y CALIDAD DE OBRA.

ESTE AMPARO CUBRE A LA ENTIDAD ESTATAL DE LOS PERJUICIOS OCASIONADOS POR CUALQUIER TIPO DE DAÑO O DETERIORO, IMPUTABLE AL CONTRATISTA, SUFRIDO POR LA OBRA ENTREGADA A SATISFACCIÓN.

1.7 AMPARO DE CALIDAD DEL SERVICIO.

ESTE AMPARO CUBRE A LA ENTIDAD ESTATAL POR LOS PERJUICIOS DERIVADOS DE LA DEFICIENTE CALIDAD DEL SERVICIO PRESTADO

1.8 AMPARO DE CALIDAD Y CORRECTO FUNCIONAMIENTO DE LOS BIENES

ESTE AMPARO CUBRE LA CALIDAD Y EL CORRECTO FUNCIONAMIENTO DE LOS BIENES QUE RECIBE LA ENTIDAD ESTATAL EN CUMPLIMIENTO DE UN CONTRATO.

1.9 RESPONSABILIDAD FISCAL

EN VIRTUD DE LO SEÑALADO EN EL ARTICULO 44 DE LA LEY 610 DE 2000, LA GARANTÍA DE CUMPLIMIENTO CUBRIRÁ LOS PERJUICIOS CAUSADOS A LA ENTIDAD ESTATAL ASEGURADA COMO CONSECUENCIA DE LA CONDUCTA DOLOSA O CULPOSA, O DE LA RESPONSABILIDAD IMPUTABLE AL CONTRATISTA GARANTIZADO, DERIVADOS DE UN PROCESO DE RESPONSABILIDAD FISCAL, SIEMPRE Y CUANDO ESOS PERJUICIOS DERIVEN DEL INCUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES SURGIDAS DEL CONTRATO AMPARADO POR LA GARANTÍA.

seguros mundial® tu compañía siempre

06/04/2021 -1317-P-05-PPSUS2R000000059-D00I
06/04/2021-1317-NT-P-05-NTPSUS2R00000060

2. EXCLUSIONES

LOS AMPAROS PREVISTOS EN LA PRESENTE PÓLIZA NO OPERARAN EN LOS CASOS SIGUIENTES:

2.1 CAUSA EXTRAÑA, ESTO ES LA FUERZA MAYOR O CASO FORTUITO, EL HECHO DE UN TERCERO O LA CULPA EXCLUSIVA DE LA VICTIMA).
2.2 DAÑOS CAUSADOS POR EL CONTRATISTA A LOS BIENES DE LA ENTIDAD NO DESTINADOS AL CONTRATO.
2.3 USO INDEBIDO O INADECUADO O LA FALTA DE MANTENIMIENTO PREVENTIVO AL QUE ESTE OBLIGADA LA ENTIDAD ESTATAL.
2.4 EL DETERIORO NORMAL QUE SUFRAN LOS BIENES ENTREGADOS CON OCASIÓN DEL CONTRATO GARANTIZADO, COMO CONSECUENCIA DEL TRANSCURSO DEL TIEMPO.

3. SUMA ASEGURADA

LA SUMA ASEGURADA DETERMINADA PARA CADA AMPARO EN LA CARATULA DE ESTA PÓLIZA, DELIMITA LA RESPONSABILIDAD MÁXIMA DE LA COMPAÑÍA EN CASO DE SINIESTRO.

4. VIGENCIA

LA VIGENCIA DE LOS AMPAROS OTORGADOS POR LA PRESENTE PÓLIZA, SE HARÁ CONSTAR EN LA CARATULA O EN SUS ANEXOS. EN LOS CONTRATOS DE QUE TRATA EL ARTÍCULO 2.2.1.2.3.1.3 DEL DECRETO 1082 DE 2015, EL GARANTE TIENE LA FACULTAD LEGAL DE DECIDIR NO GARANTIZAR LA ETAPA SIGUIENTE, CASO EN EL CUAL DEBE INFORMAR SU DECISIÓN POR ESCRITO A LA ENTIDAD ESTATAL GARANTIZADA SEIS (6) MESES ANTES DEL VENCIMIENTO DEL PLAZO DE LA GARANTÍA. ESTE AVISO NO AFECTA LA GARANTÍA DE LA ETAPA CONTRACTUAL O PERÍODO CONTRACTUAL EN EJECUCIÓN. SI EL GARANTE NO DA EL AVISO CON LA ANTICIPACIÓN MENCIONADA Y EL CONTRATISTA NO OBTIENE UNA NUEVA GARANTÍA, QUEDA OBLIGADO A GARANTIZAR LA ETAPA DEL CONTRATO O EL PERÍODO CONTRACTUAL SUBSIGUIENTE.

seguros mundial® tu compañía siempre

5. EFECTIVIDAD DE LA GARANTÍA

DE ACUERDO CON LO ESTABLECIDO EN EL ARTÍCULO 1077 EN CONCORDANCIA CON EL ARTÍCULO 1080 DEL CÓDIGO DE COMERCIO LA ENTIDAD ESTATAL ASEGURADA DEBERÁ DEMOSTRAR LA OCURRENCIA DEL SINIESTRO Y ACREDITAR LA CUANTÍA DE LA PERDIDA PREVIO AGOTAMIENTO DEL DERECHO DE DEFENSA DEL CONTRATISTA Y DEL GARANTE, DE LA SIGUIENTE FORMA:

5.1 EN CASO DE CADUCIDAD, UNA VEZ AGOTADO EL DEBIDO PROCESO Y GARANTIZADOS LOS DERECHOS DE DEFENSA Y CONTRADICCIÓN DEL CONTRATISTA Y DE SU GARANTE DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN EL ARTÍCULO 86 DE LA LEY 1474 DE 2011, POR MEDIO DEL ACTO ADMINISTRATIVO EN EL CUAL LA ENTIDAD ESTATAL DECLARE LA CADUCIDAD DEL CONTRATO Y ORDENE EL PAGO AL CONTRATISTA Y AL GARANTE, BIEN SEA DE LA CLÁUSULA PENAL O DE LOS PERJUICIOS QUE HA CUANTIFICADO. EL ACTO ADMINISTRATIVO DE CADUCIDAD CONSTITUYE EL SINIESTRO.

5.2 EN CASO DE APLICACIÓN DE MULTAS, UNA VEZ AGOTADO EL DEBIDO PROCESO Y GARANTIZADOS LOS DERECHOS DE DEFENSA Y CONTRADICCIÓN DEL CONTRATISTA Y DE SU GARANTE DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN EL ARTÍCULO 86 DE LA LEY 1474 DE 2011, POR MEDIO DEL ACTO ADMINISTRATIVO EN EL CUAL LA ENTIDAD ESTATAL IMPONE MULTAS, DEBE ORDENAR EL PAGO AL CONTRATISTA Y AL GARANTE. EL ACTO ADMINISTRATIVO CORRESPONDIENTE CONSTITUYE EL SINIESTRO.

5.3 EN LOS DEMÁS CASOS DE INCUMPLIMIENTO, UNA VEZ AGOTADO EL DEBIDO PROCESO Y GARANTIZADOS LOS DERECHOS DE DEFENSA Y CONTRADICCIÓN DEL CONTRATISTA Y DE SU GARANTE DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN EL ARTÍCULO 86 DE LA LEY 1474 DE 2011, POR MEDIO DEL ACTO ADMINISTRATIVO EN EL CUAL LA ENTIDAD ESTATAL DECLARE EL INCUMPLIMIENTO, PUEDE HACER EFECTIVA LA CLÁUSULA PENAL, SI ESTÁ PACTADA EN EL CONTRATO, Y ORDENAR SU PAGO AL CONTRATISTA Y AL GARANTE. EL ACTO ADMINISTRATIVO CORRESPONDIENTE ES LA RECLAMACIÓN PARA LA COMPAÑÍA DE SEGUROS.

6. PROCEDIMIENTO PARA LA IMPOSICIÓN DE MULTAS, SANCIONES Y DECLARATORIAS DE INCUMPLIMIENTO.

LAS ENTIDADES SOMETIDAS AL ESTATUTO GENERAL DE CONTRATACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN PÚBLICA PODRÁN DECLARAR EL INCUMPLIMIENTO, CUANTIFICANDO LOS PERJUICIOS DEL MISMO, IMPONER LAS MULTAS Y SANCIONES PACTADAS EN EL CONTRATO, Y HACER EFECTIVA LA CLÁUSULA PENAL. PARA TAL EFECTO OBSERVARAN EL SIGUIENTE PROCEDIMIENTO:

A) EVIDENCIADO UN POSIBLE INCUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES A CARGO DEL CONTRATISTA, LA ENTIDAD PÚBLICA LO CITARA A AUDIENCIA PARA DEBATIR LO OCURRIDO. EN LA CITACIÓN, HARÁ MENCIÓN EXPRESA Y DETALLADA DE LOS HECHOS QUE LA SOPORTAN, ACOMPAÑANDO EL INFORME DE INTERVENTORÍA O DE SUPERVISIÓN EN EL QUE SE SUSTENTE LA ACTUACIÓN Y ENUNCIARA LAS NORMAS O CLAUSULAS POSIBLEMENTE VIOLADAS Y LAS CONSECUENCIAS QUE PODRÍAN DERIVARSE PARA EL CONTRATISTA EN DESARROLLO DE LA ACTUACIÓN. EN LA MISMA SE ESTABLECERÁ EL LUGAR, FECHA Y HORA PARA LA REALIZACIÓN DE LA AUDIENCIA, LA QUE PODRÁ TENER LUGAR A LA MAYOR BREVEDAD POSIBLE, ATENDIDA LA NATURALEZA DEL CONTRATO Y LA PERIODICIDAD ESTABLECIDA PARA EL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRACTUALES. EN EL EVENTO EN QUE LA GARANTÍA DE CUMPLIMIENTO CONSISTA EN PÓLIZA DE SEGUROS, EL GARANTE SERÁ CITADO DE LA MISMA MANERA;

B) EN DESARROLLO DE LA AUDIENCIA, EL JEFE DE LA ENTIDAD O SU DELEGADO, PRESENTARÁ LAS CIRCUNSTANCIAS DE HECHO QUE MOTIVAN LA ACTUACIÓN, ENUNCIARÁ LAS POSIBLES NORMAS O CLÁUSULAS POSIBLEMENTE VIOLADAS Y LAS CONSECUENCIAS QUE PODRÍAN DERIVARSE PARA EL CONTRATISTA EN DESARROLLO DE LA ACTUACIÓN. ACTO SEGUIDO SE CONCEDERÁ EL USO DE LA PALABRA AL REPRESENTANTE LEGAL DEL CONTRATISTA O A QUIEN LO REPRESENTE, Y AL GARANTE, PARA QUE PRESENTEN SUS DESCARGOS, EN DESARROLLO DE LO CUAL PODRÁ RENDIR LAS EXPLICACIONES DEL CASO, APORTAR PRUEBAS Y CONTROVERTIR LAS PRESENTADAS POR LA ENTIDAD;

C) HECHO LO PRECEDENTE, MEDIANTE RESOLUCIÓN MOTIVADA EN LA QUE SE CONSIGNE LO OCURRIDO EN DESARROLLO DE LA AUDIENCIA Y LA CUAL SE ENTENDERÁ NOTIFICADA EN DICHO

06/04/2021 -1317-P-05-PPSUS2R000000059-D00I
06/04/2021-1317-NT-P-05-NTPSUS2R00000060

ACTO PÚBLICO, LA ENTIDAD PROCEDERÁ A DECIDIR SOBRE LA IMPOSICIÓN O NO DE LA MULTA, SANCIÓN O DECLARATORIA DE INCUMPLIMIENTO. CONTRA LA DECISIÓN ASÍ PROFERIDA SÓLO PROCEDE EL RECURSO DE REPOSICIÓN QUE SE INTERPONDRÁ, SUSTENTARÁ Y DECIDIRÁ EN LA MISMA AUDIENCIA. LA DECISIÓN SOBRE EL RECURSO SE ENTENDERÁ NOTIFICADA EN LA MISMA AUDIENCIA;

D) EN CUALQUIER MOMENTO DEL DESARROLLO DE LA AUDIENCIA, EL JEFE DE LA ENTIDAD O SU DELEGADO, PODRÁ SUSPENDER LA AUDIENCIA CUANDO DE OFICIO O A PETICIÓN DE PARTE, ELLO RESULTE EN SU CRITERIO NECESARIO PARA ALLEGAR O PRACTICAR PRUEBAS QUE ESTIME CONDUCENTES Y PERTINENTES, O CUANDO POR CUALQUIER OTRA RAZÓN DEBIDAMENTE SUSTENTADA, ELLO RESULTE NECESARIO PARA EL CORRECTO DESARROLLO DE LA ACTUACIÓN ADMINISTRATIVA. EN TODO CASO, AL ADOPTAR LA DECISIÓN, SE SEÑALARÁ FECHA Y HORA PARA REANUDAR LA AUDIENCIA. LA ENTIDAD PODRÁ DAR POR TERMINADO EL PROCEDIMIENTO EN CUALQUIER MOMENTO, SI POR ALGÚN MEDIO TIENE CONOCIMIENTO DE LA CESACIÓN DE SITUACIÓN DE INCUMPLIMIENTO.

7. COMPENSACIÓN

SI LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE ASEGURADA AL MOMENTO DE TENER CONOCIMIENTO DEL INCUMPLIMIENTO, O CON POSTERIORIDAD A ESTE O DEL RESULTADO DE LA LIQUIDACIÓN, FUERE DEUDORA DEL CONTRATISTA GARANTIZADO POR CUALQUIER CONCEPTO, SE APLICARA LA COMPENSACIÓN Y LA INDEMNIZACIÓN SE DISMINUIRÁ EN EL MONTO DE LAS ACREENCIAS, SEGÚN LA LEY, DE CONFORMIDAD CON LO SEÑALADO EN LOS ARTÍCULOS 1417 Y SS. DEL CÓDIGO CIVIL. IGUALMENTE DISMINUIRÁ EL VALOR DE LA INDEMNIZACIÓN, EL CORRESPONDIENTE A LOS BIENES QUE LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE ASEGURADA HAYA OBTENIDO DEL CONTRATISTA GARANTIZADO JUDICIAL O EXTRAJUDICIALMENTE, EN EJERCICIO DE LAS ACCIONES DERIVADAS DEL CONTRATO CUYO CUMPLIMIENTO SE GARANTIZA POR LA PRESENTE PÓLIZA.

8. PAGO DEL SINIESTRO.

LA ASEGURADORA PAGARA EL VALOR DEL SINIESTRO, ASÍ:

8.1 PARA EL CASO PREVISTO EN EL NUMERAL 5.1, DENTRO DEL MES SIGUIENTE A LA COMUNICACIÓN ESCRITA QUE CON TAL FIN HAGA LA ENTIDAD CONTRATANTE PARA RECLAMAR EL PAGO, ACOMPAÑADA DE UNA COPIA AUTENTICA DEL ACTO ADMINISTRATIVO CORRESPONDIENTE EJECUTORIADO Y DEL ACTA DE LIQUIDACIÓN DEL CONTRATO O DE LA RESOLUCIÓN EJECUTORIADA QUE ACOJA LA LIQUIDACIÓN UNILATERAL.

8.2 PARA EL CASO DEL NUMERAL 5.2, DENTRO DEL MES SIGUIENTE A LA COMUNICACIÓN ESCRITA QUE HAGA LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE, ACOMPAÑADA DE LA COPIA AUTENTICA DEL ACTO ADMINISTRATIVO CORRESPONDIENTE EJECUTORIADO, JUNTO CON LA CONSTANCIA DE LA ENTIDAD ESTATAL DE LA NO EXISTENCIA DE SALDOS A FAVOR DEL CONTRATISTA RESPECTO DE LOS CUALES SE PUEDA APLICAR LA COMPENSACIÓN DE QUE TRATA LA CONDICIÓN SEXTA DE ESTE CLAUSULADO, O EN LA QUE CONSTE LA DISMINUCIÓN EN EL VALOR A INDEMNIZAR EN VIRTUD DE LA COMPENSACIÓN.

06/04/2021 -1317-P-05-PPSUS2R000000059-D00I
06/04/2021-1317-NT-P-05-NTPSUS2R00000060

8.3 PARA EL CASO PRESENTADO EN EL NUMERAL 5.3, DENTRO DEL MES SIGUIENTE A LA COMUNICACIÓN ESCRITA QUE CON TAL FIN HAGA LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE, ACOMPAÑADA DE UNA COPIA AUTENTICA DEL ACTO ADMINISTRATIVO QUE CONSTITUYA LA OCURRENCIA DEL SINIESTRO, JUNTO CON LA CONSTANCIA DE LA ENTIDAD ESTATAL DE LA NO EXISTENCIA DE SALDOS AL FAVOR DEL CONTRATISTA RESPECTO DE LOS CUALES SE PUEDA APLICAR LA COMPENSACIÓN DE QUE TRATA LA CONDICIÓN SEXTA DE ESTE CLAUSULADO O EN LA QUE CONSTE LA DISMINUCIÓN EN EL VALOR A INDEMNIZAR EN VIRTUD DE LA COMPENSACIÓN.

PARÁGRAFO. – DE CONFORMIDAD CON EL ARTÍCULO 1110 DEL CÓDIGO DE COMERCIO LA ASEGURADORA PODRÁ OPTAR POR CUMPLIR SU PRESTACIÓN MEDIANTE EL PAGO DE LA INDEMNIZACIÓN, O CONTINUANDO CON LA EJECUCIÓN DE LA OBLIGACIÓN GARANTIZADA, PARA ESTE ÚLTIMO EVENTO SE REQUIERE LA ACEPTACIÓN DE LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE ASEGURADA.

LA DECLARATORIA DE CADUCIDAD NO IMPEDIRÁ QUE LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE ASEGURADA TOME POSESIÓN DE LA OBRA O CONTINÚE INMEDIATAMENTE LA EJECUCIÓN DEL OBJETO CONTRATADO, BIEN SEA A TRAVÉS DEL GARANTE O DE OTRO CONTRATISTA.

EN EL EVENTO QUE POR INCUMPLIMIENTO DEL CONTRATISTA GARANTIZADO LA ASEGURADORA RESOLVIERA CONTINUAR, COMO CESIONARIO O A FAVOR DE QUIEN DETERMINE ESTA, CON LA EJECUCIÓN DEL CONTRATO Y LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE ASEGURADA ESTUVIESE DE ACUERDO CON ELLO, EL CONTRATISTA GARANTIZADO ACEPTA DESDE AHORA LA CESIÓN DEL CONTRATO A FAVOR DE LA ASEGURADORA. EN TAL EVENTO LA ASEGURADORA PRESENTARÁ GARANTÍAS.

9. CERTIFICADOS DE MODIFICACIÓN

PARA LOS CASOS EN QUE LA SUMA ASEGURADA SEA AUMENTADA O DISMINUIDA Y PARA AQUELLOS EN LOS CUALES LAS ESTIPULACIONES DEL CONTRATO ORIGINAL SEAN MODIFICADAS, LA ASEGURADORA A SOLICITUD DEL CONTRATISTA GARANTIZADO EXPEDIRÁ UN CERTIFICADO O ANEXO DE MODIFICACIÓN DEL SEGURO, EN DONDE EXPRESE SU CONOCIMIENTO AL RESPECTO DE LAS MODIFICACIONES ACORDADAS ENTRE EL CONTRATISTA GARANTIZADO Y LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE ASEGURADA.

10. SUBROGACIÓN

EN VIRTUD DEL PAGO DE LA INDEMNIZACIÓN, DE ACUERDO CON EL ARTICULO 1096 DEL CÓDIGO DE COMERCIO, EN CONCORDANCIA CON EL ARTÍCULO 203 DEL DECRETO 663 DE 1993 ESTATUTO ORGÁNICO DEL SISTEMA FINANCIERO, LA ASEGURADORA SE SUBROGA HASTA CONCURRENCIA DE SU IMPORTE, EN TODOS LOS DERECHOS QUE LA ENTIDAD ESTATAL CONTRATANTE TENGA CONTRA EL CONTRATISTA GARANTIZADO.

11. NO EXPIRACIÓN POR FALTA DE PAGO DE PRIMA E IRREVOCABILIDAD

LA PRESENTE PÓLIZA NO EXPIRARA POR FALTA DE PAGO DE LA PRIMA NI POR REVOCACIÓN UNILATERAL.

06/04/2021 -1317-P-05-PPSUS2R000000059-D00I
06/04/2021-1317-NT-P-05-NTPSUS2R00000060

12. NATURALEZA DEL SEGURO

LA GARANTÍA OTORGADA POR ESTA PÓLIZA O SUS CERTIFICADOS DE MODIFICACIÓN, NO ES SOLIDARIA, NI INCONDICIONAL Y SU EXIGENCIA ESTÁ SUPEDITADA A LA OCURRENCIA DEL SINIESTRO Y SU CUANTIFICACIÓN.

13. NOTIFICACIONES Y RECURSOS

LA ENTIDAD CONTRATANTE DEBERÁ NOTIFICAR A LA ASEGURADORA LOS ACTOS ADMINISTRATIVOS ATINENTES A LA EFECTIVIDAD DE LA PÓLIZA, PREVIO AGOTAMIENTO DEL DERECHO DE DEFENSA DEL CONTRATISTA GARANTIZADO Y EL GARANTE.

14. COEXISTENCIA DE SEGUROS

EN CASO DE EXISTIR, AL MOMENTO DE SINIESTRO, OTRO SEGURO DE CUMPLIMIENTO CON RELACIÓN AL MISMO CONTRATO, EL IMPORTE DE LA INDEMNIZACIÓN A QUE HAY LUGAR, SE DISTRIBUIRÁ ENTRO LOS ASEGURADORES EN PROPORCIÓN A LAS CUANTÍAS DE SUS RESPECTIVOS SEGUROS

15. COASEGURO

EN CASO DE EXISTIR COASEGURO AL QUE SE REFIERE EL ARTÍCULO 1095 DE CÓDIGO DE COMERCIO, EL IMPORTE DE LA INDEMNIZACIÓN A QUE HAYA LUGAR SE DISTRIBUIRÁ ENTRE LOS ASEGURADORES EN PROPORCIÓN DE LAS CUANTÍAS DE SUS RESPECTIVOS SEGUROS, SIN QUE EXISTA SOLIDARIDAD ENTRE LAS ASEGURADORAS PARTICIPANTES, Y SIN EXCEDER DE LA SUMA ASEGURADA BAJO EL CONTRATO DE SEGURO.

16. PRESCRIPCIÓN

LA PRESCRIPCIÓN DE LAS ACCIONES DERIVADAS DEL PRESENTE CONTRATO SE REGIRÁ POR LAS NORMAS DEL CÓDIGO DE COMERCIO SOBRE CONTRATO DE SEGURO.

17. DOMICILIO

SIN PERJUICIO DE LAS DISPOSICIONES PROCESALES, PARA LOS EFECTOS RELACIONADOS EN EL PRESENTE CONTRATO SE FIJA COMO DOMICILIO DE LAS PARTES LA CIUDAD DE BOGOTÁ EN LA REPÚBLICA DE COLOMBIA EN FE DE LO ANTERIOR, SE FIRMA A LOS _____DÍAS DEL MES DE_____ DE 20____

COMPAÑÍA MUNDIAL DE SEGUROS S.A.	**EL TOMADOR/ASEGURADO**

seguros mundial® tu compañía siempre

06/04/2021 -1317-P-05-PPSUS2R000000059-D00I
06/04/2021-1317-NT-P-05-NTPSUS2R00000060

seguros mundial®
tu compañía siempre
NIT 860.037.013-6
SOMOS GRANDES CONTRIBUYENTES
IVA RÉGIMEN COMÚN - AUTORETENEDORES

COMPAÑÍA MUNDIAL DE SEGUROS S.A.

Afiliados
CÁMARA COLOMBIANA DE LA INFRAESTRUCTURA
PASA APF
Asociación Panamericana de Fianzas
Panamerican Surety Association

LA COMPAÑIA MUNDIAL DE SEGUROS S.A

CERTIFICA:

Que la garantía de Cumplimiento contenida en la póliza **NB-100355868** y endoso, **0** cuyo afianzado es: **ZOOLAB S.A.S** Asegurado o Beneficiario: **SENA REGIONAL CUNDINAMARCA GRUPO ADMINISTRATIVO CBA / SENA REGIONAL CUNDINAMARCA GRUPO ADMINISTRATIVO CBA** , expedida por la Compañía en **15/11/2024,** no expirará por falta de pago de la prima de la póliza o de los certificados o anexos que se expidan con fundamento en ella o por revocación unilateral por parte del Tomador o de la Compañía.

BOGOTA a los **15** días del mes **NOVIEMBRE** del año **2024.**

Firma Autorizada - Compañia Mundial de Seguros S.A.

VIGILADO SUPERINTENDENCIA FINANCIERA DE COLOMBIA

Cumplimos los sueños de nuestro planeta reciclando responsablemente.
Protege el Medio Ambiente evitando la impresión de este documento.

AFILIADOS A LA CÁMARA COLOMBIANA DE LA INFRAESTRUCTURA Y PASA - APF

seguros mundial®

Mundial de Seguros S.A.
860.037.013-6

Recibo de Pago

- CLIENTE-

Referencia de Pago No.	72170170

Fecha de Facturación	15/11/2024
POLIZA DE SEGURO DE CUMPLIMIENTO ENTIDADES ESTATALES DECRETO 1082	
Póliza No.	NB–100355868
Periodo Facturado	12/11/2024 — 27/04/2025

Fecha Límite de Pago	15/12/2024
Prima (incluye gastos de expedición)	26.830,00
IVA	5.098,00
VALOR TOTAL A PAGAR $	31.928,00

EFECTIVO $

Datos del Cliente

Nombre / Razón Social	ZOOLAB S.A.S
CR 73 #53 04	830085197
Intermediario	DELFUTURO SEGUROS LTDA

Cheque

Banco	No Cuenta	No Cheque	Valor Cheque
TOTAL			

Apreciado Cliente:

1. No se aceptan pagos parciales.
2. Al realizar su pago de forma presencial (ante el cajero del banco) **UNICAMENTE** presente esta boleta de recaudo para garantizar la correcta referenciación del pago.
3. Si esta boleta no ha sido recaudada efectivamente el **15/12/2024** se aplicará la clausula de terminación automática especifiada en el condicionado de la póliza y en la carátula de esta (artículo1068 código de comercio)
4. Si realiza su pago en cheque o de forma mixta (efectivo y cheque), solamente gire cheque local a nombre de **PATRIMONIOS AUTÓNOMOS CREDICORP CAPITAL FIDUCIARIA Nit 900531292-7,** al respaldo endóselo correctame y diligencie los datos del girador (nombre, NIT, teléfono) y el número de referencia de esta boleta. En caso de devolución del cheque se cobrará sanción del 20% de acuerdo con lo establecido en el artículo 731 del código de comercio. **NO SE ACEPTAN CHEQUES DE OTRAS PLAZAS.**
5. Para realizar el pago a través del botón PSE, ingrese a nuestra página web **www.segurosmundial.com.co** en la imagen de PSE haga clic y continúe el proceso de pago.

ESPACIO PARA EL TIMBRE

VÁLIDO COMO RECIBO DE PAGO

- BANCO -

Referencia de Pago No.	72170170

Fecha de Facturación	15/11/2024
POLIZA DE SEGURO DE CUMPLIMIENTO ENTIDADES ESTATALES DECRETO 1082	
Póliza No.	NB–100355868
Periodo Facturado	12/11/2024 — 27/04/2025

Fecha Límite de Pago	15/12/2024
Prima (incluye gastos de expedición)	26.830,00
IVA	5.098,00
VALOR TOTAL A PAGAR $	31.928,00

EFECTIVO $

Datos del Cliente

Nombre / Razón Social	ZOOLAB S.A.S
CR 73 #53 04	830085197
Intermediario	DELFUTURO SEGUROS LTDA

Cheque

Banco	No Cuenta	No Cheque	Valor Cheque
TOTAL			

Corresponsales OPCIÓN1

(415)7709998434219(8020)000000072170170(3900)000000031928(96)20241215

Bancos Corresponsales OPCIÓN 2

(415)7709998039933(8020)031594(8020)22990072170170(3900)000000031928(96)20241215

VIGILADO SUPERINTENDENCIA FINANCIERA DE COLOMBIA

seguros mundial®

Recibo de Pago

Mundial de Seguros S.A.
860.037.013-6

INFORMACIÓN DE PAGO

A continuación te brindamos información de los distintos medios de pago que tendrás a disposición:

OPCIÓN 1

CORRESPONSALES

Carulla · grupo éxito · efecty · edeq · Bancolombia Corresponsal Bancario · Punto de pago Multibanco · Supermercado Mercar · 4-72

OPCIÓN 2

BANCOS

Scotiabank · DAVIVIENDA · Banco de Bogotá · Bancolombia · Banco de Occidente

CORRESPONSALES

puntored Te damos más

VIGILADO SUPERINTENDENCIA FINANCIERA DE COLOMBIA

Tu compañía siempre

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Señores
Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA
Ciudad.

Asunto: contratación MC-CMC-CBA-0019-2024

Respetados señores:

Yo SANDRA LILIANA CORTES AVELLANEDA_, identificado como aparece al pie de mi firma, obrando como representante legal de ZOOLAB SAS, declaro bajo juramento no tener sanciones ni medidas preventivas abiertas o proceso de ejecución ante las autoridades ambientales.

En constancia de lo anterior firmo este documento a los _24___ días del mes de __OCTUBRE__de 2024.

Atentamente,

Nombre o Razón Social del Proponente: _ZOOLAB SAS_____
NIT ___830.085.197-8___
Nombre del Representante Legal: __SANDRA LILIANA CORTES AVELLANEDA____
C.C. No. ___52.265.505___.
Dirección: __CARRERA 73 #53-04____
Teléfonos: __3133776385____
Correo Electrónico___gerencia@zoolabcolombia.com___

FIRMA:

Bogotá, noviembre 1 de 2024

A QUIEN CORRESPONDA

De acuerdo con la Resolución 40595 de 2022, la cual establece que toda entidad, organización o empresa del sector público o privado, que cuente con una flota de vehículos automotores o no automotores superior a diez (10) unidades, o que contrate o administre personal de conductores, deberá diseñar e implementar un Plan Estratégico de Seguridad Vial en función de su misionalidad y tamaño, de acuerdo con la metodología expedida por el Ministerio de Transporte y articularlo con su Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo -SGSST, bajo este marco legal indicamos que:

ZOOLAB S.A.S. es una organización dedicada a la actividad de diagnóstico clínico veterinario lo cual no requiere contar con flota vehicular ni la contratación de conductores.

Por lo anterior y al realizar el análisis de la aplicabilidad de los requisitos establecidos en la Resolución 40595 de 2022, Zoolab se encuentra clasificada entre las organizaciones cuya actividad es diferente a la prestación del servicio de transporte y no cumple con los requisitos mínimos establecidos en el tamaño 1 -nivel básico (Organizaciones con una flota de vehículos automotores o no automotores entre (11) y (49) unidades o que contraten o administren entre dos (2) y cuarenta y nueve (49) conductores.)

Sin embargo, y con el propósito de reducir la siniestralidad vial y fortalecer la gestión del riesgo público al cual se encuentran expuestos nuestros trabajadores, ZOOLAB SAS genera espacios de formación y capacitación para sus trabajadores que ayuden a la concientización de los riesgos viales de acuerdo con los diferentes actores viales.

Cordialmente,

SANDRA LILIANA CORTÉS
Representante Legal
cc. 52265505

LUISA FERNANDA CORTÉS
Psicóloga Especialista en SST
resolución No. 7603 de 01/03/2021

Bogota, 4 de noviembre de 2024

Señores
SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE – SENA
Comite evaluador
Mosquera
Ciudad

REFERENCIA: CERTIFICACION COMERCIALIZACION DE INSUMOS AGROPECUARIOS – SELECCIÓN DE MINIMA CUANTIA MC-CMC-CBA-019-2024-1

Respetadso señores

Como represenante legal de ZOOLAB SAS identificada con Nit 830.085.197-8, me permito certificar que somos una empesa legalmente constituida, dedicada a ofecer servicios de aistencia, asesoria y realizacion de pruebas de laboratorio asi como asesoria en programas sanitarios, dentro de los cuales es necesario administracion de vacunas o proveer insumos agropecuarios, los cuales se realizan siguiendo los procesos establecidos para tal fin por las diferentes autoridades.

1. Adquisicion de vacunas anti-brucella (Cepa 19 y RB51) y Vacuna anti-aftosa: FEDEGAN, ICA o Comites ganaderos quienes son las unicas entidades autorizadas para su comercializacion
2. Coordinar procesos de vacunacion con entidades autorizadas

Cordial saludo

SANDRA LILIANA CORTES AVELLANEDA
Representante legal
Zoolab SAS
Nit 830.085.197-8

1. INTRODUCCIÓN

En el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab se han implementado pruebas de identificación bacteriológica y micológica. Existe un amplio número de microorganismos que pueden generar infecciones en animales, sin embargo, se han adoptado los métodos adecuados a la infraestructura actual del laboratorio que permiten la identificación de microorganismos frecuentemente involucrados en cuadros clínicos animales, El método de identificación estándar se basa en la inoculación de una muestra sospechosa en medios de cultivo específicos y enriquecidos para el óptimo crecimiento del microorganismo.

2. PROPÓSITO

Unificar las actividades que se deben llevar a cabo para la realización de pruebas de bacteriología y micología en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.

3. ALCANCE

Aplica para la ejecución de los ensayos descritos en este POE, de acuerdo con el Numeral 7.2 - 7.2.1 Selección y Verificación de Métodos de la NTC-ISO/IEC 17025:2017.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Luna Fontalvo, J. A. (2020). Métodos analíticos de microbiología general y aplicada. Santa Marta, Editorial Unimagdalena.
- https://www.insumolab.cl/descargas/area_clinica/tubos/12x100/ficha_tecnica/15.pdf preparación de tolerancia 6.5.
- Calvino, L. y cols. Tratamiento de mastitis clínicas y manejo de antibióticos en el tambo. APROCAL, diciembre 23 de 2015.
- Manual de Procedimientos en Bacteriología Clínica. Biobacter. Sánchez, María Piedad. 2007.
- Manual de las Pruebas Diagnósticas para los Animales Terrestres. Capítulo 1.1.6. OIE Organización Mundial de Sanidad Animal, 2008.
- Manual de Laboratorio para la Identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo. OMS. Organización mundial de la salud 2004.
- Manual de procedimientos para el aislamiento y la identificación del *Campylobacter spp*. Instituto Nacional De Salud. Realpe María Elena. Julio de 2011.
- MANUAL DE PROCEDIMIENTOS CAMPYLOBACTER. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires, Argentina, 2001.
- Koneman, Diagnostico bacteriológico, texto y atlas a color, 6ed, Panamericana, Argentina, 2006.
- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bacteriología Teoría y Práctica. Editorial COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA 2013.
- Intructions for Use: Bruker Bacterial Test Standard. 2012
- Bruker Guide to MALDI sample preparation. 2012.
- Procedure for identification of yeast using MALDI-TOF. 2020

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

5. DEFINICIONES

- **AGAR-AGAR**: Polisacárido que se obtiene de algunas especies de algas y que la mayoría de los medios de cultivos sólidos contienen. La palabra “agar” es utilizada comúnmente para llamar a los medios de cultivos sólidos.

- **AISLAMIENTO:** Procedimiento mediante el cual se separan los microorganismos desde cualquier muestra o ambiente en un medio de cultivo, para obtener colonias puras.

- **ANTIBIOGRAMA:** Prueba que permite establecer la susceptibilidad bacteriana frente a antibióticos.

- **ANTIBIÓTICOS:** Sustancias producidas por algunas bacterias u hongos o fármacos sintéticos que inhiben el crecimiento de los microorganismos.

- **ASAS DE SIEMBRA:** Instrumento elaborado en una mezcla de metales (platino, acero, aluminio y cromo) que se emplea para transportar los inóculos y realizar las siembras de los microorganismos.

- **ASEPSIA:** Es la ausencia de microorganismos en ambientes, instrumentos de laboratorio y muestras biológicas. Esta se logra con un buen procedimiento de esterilización.

- **BATERÍA BIOQUÍMICA:** Es el conjunto de medios de cultivos o sustratos específicos que se emplean para la identificación bioquímica de las bacterias.

- **BTS**: Bacterial Test Standard.

- **CEPA:** Población de células genéticamente idénticas derivadas de una única célula. También se definen como el conjunto de especies bacterianas que comparten al menos una característica.

- **COLONIAS:** Conjunto de células microbianas formadas en la superficie de un medio de cultivo sólido. Las colonias presentan variaciones en aspectos de la morfología como los bordes, la elevación, la textura y la coloración.

- **COLORACIÓN:** Tinciones con diferentes colorantes que facilitan la visualización y diferenciación de los microorganismos observados al microscopio, esta permite ver características especiales de los mismos para así identificarlos y clasificarlos adecuadamente.

- **CONTAMINACIÓN**: Es la alteración de un cultivo microbiano puro por la presencia de otro microorganismo. También hace referencia a la presencia de microorganismos infecciosos en muestras de alimentos, medicamentos, agua para consumo y ambientes limpios.

- **CULTIVO AXÉNICO:** Es un cultivo conformado por una sola especie proveniente de una sola célula bacteriana. Se puede decir que un cultivo axénico es un cultivo puro.

- **CULTIVO MIXTO:** Es un cultivo conformado por dos o más células bacterianas de diferentes especies.

- **DESINFECCIÓN:** Es el procedimiento físico o químico mediante el cual se busca eliminar o inactivar los microorganismos presentes en un área, superficie, objeto o instrumento. La desinfección se logra con el

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

uso de sustancias químicas llamadas desinfectantes, como el alcohol antiséptico, solución de hipoclorito de sodio, peróxidos, yoduros, etc., que actúan de manera bacteriostática.

- **DILUCIONES SERIADAS**: Es un procedimiento mediante el cual se busca disminuir la concentración gradual de microorganismos presentes en una muestra. La dilución parte de un volumen conocido de la muestra (solución madre) y se lleva a un tubo de ensayo que contiene un volumen exacto de agua peptonada 0,1% o agua desionizada estéril, y a partir de este se lleva a otro tubo con igual volumen hasta donde se logre definir la concentración más baja o concentración deseada.

- **ESTERILIZACIÓN:** Es el proceso mediante el cual se matan o eliminan los microorganismos presentes en cualquier objeto o ambiente. La esterilización se realiza a través de mecanismos físicos como el tratamiento térmico con calor directo (fuego), calor húmedo (autoclaves) y calor seco (estufas); radiación (luz UV), filtración (filtros de 0,22-0,45 µm) y procedimientos químicos empleando reactivos como ácidos, alcoholes, aldehídos y fenoles.

- **ESPORA:** Estructura que se forma dentro o fuera de un microorganismo para sobrevivir durante un largo periodo de tiempo en el huésped causándole síntomas clínicos.

- **FERMENTACIÓN**: Es el proceso metabólico que realizan los microorganismos como bacterias y hongos en condiciones anaeróbicas. Consiste en transformar un compuesto orgánico, por ejemplo, un azúcar (glucosa), en otro compuesto orgánico, como ácidos orgánicos (ácido fórmico, cítrico, succínico, etc.), alcoholes (butanol, etanol, etc.) y gases (CO_2 y CH_4).

- **FLAGELO:** Es una estructura filamentosa que ayuda a la célula a desplazarse y moverme más rápido. Es una característica que solo comparten cierto grupo de microorganismos.

- **FLORA NORMAL:** Conjunto de microorganismos que pueden albergarse en un individuo sano sin cambiar su condición normal, pero cuando ocurre alguna alteración ya sea por causas endógenas o exógenas, aquellos microorganismos pueden desarrollar procesos infecciosos en cualquier ubicación anatómica del organismo que los hospeda, presentándose signos clínicos.

- **FLORA PATÓGENA:** Conjunto de microorganismos que habitualmente no se albergan en un individuo sano que generalmente causan procesos infecciosos en cualquier ubicación anatómica del organismo que los hospeda, presentándose signos clínicos.

- **HCCA:** ácido α-ciano-4-hidroxicinámico.

- **HOSPEDERO NORMAL:** Individuo que alberga un microorganismo sin detrimento para su salud.

- **HUESPED NORMAL:** Individuo que alberga un microorganismo sin detrimento para su salud.

- **INCUBACIÓN**: Se refiere al proceso mediante el cual los organismos o microorganismos crecen bajo condiciones controladas de temperatura. Por lo general, la incubación de los cultivos bacterianos en el laboratorio se realiza a una temperatura de 35-37 °C durante 24 horas.

- **INFECCIÓN**: Es la introducción y multiplicación de un microorganismo patógeno en un organismo

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

huésped al cual le genera un daño o trastorno. Las infecciones pueden ser locales o sistémicas, causadas por bacterias, hongos, virus y protozoos.

- **INÓCULO:** Suspensión de microorganismos presentes en una muestra biológica (tejidos, órganos, sustancias de secreción, etc.) o en muestras de alimentos, agua, suelos o ambientes. También se conoce como inóculo la pequeña cantidad de muestra que contiene los microorganismos que se depositan en un medio de cultivo o que son transferidos a un huésped**.**

- **MALDI-TOF:** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. Desorción/ionización láser asistida por matriz.

- **MEDIOS DE CULTIVO**: Son preparados sólidos, semisólidos o líquidos, estériles, que contienen todos los nutrientes necesarios y en la cantidad adecuada para el desarrollo de los microorganismos.

- **MEDIO DE TRANSPORTE:** Medio que mantiene la viabilidad de un microorganismo por un tiempo prologando para poder ser conservado hasta que este es cultivado en el laboratorio. Está conformado por un agar semisólido, buffer y sales.

- **PATÓGENO**: Agente biológico que tiene la capacidad de causar enfermedad o daño en un organismo huésped. Entre los microorganismos patógenos más agresivos se encuentran las bacterias, los virus y los hongos.

- **SENSIDISCOS**: Discos de papel que contienen un antibiótico de concentración conocida. Se emplean para determinar la sensibilidad o resistencia de un microorganismo frente a un antibiótico a través de técnicas semicuantitativas como los antibiogramas por difusión en agar por discos.

- **TINCIÓN:** Es la acción de teñir las células microbianas mediante la aplicación de sustancias químicas conocidas como colorantes. Según la cantidad de colorantes que se emplean, las tinciones pueden ser simples o compuestas. Buscan dar realce y definición a la forma y agrupación de las células.

- **TORUNDA**: Son bolitas de algodón que debido a su alta capacidad de absorción son idóneas, entre otras cosas, **para** la eliminación de sangre, secreciones, agua y suciedad de heridas.

- **SIEMBRAS MICROBIOLÓGICAS**: Procedimiento que consiste en introducir un inóculo en un medio de cultivo con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Las siembras se realizan con ayuda de un asa, a través de diferentes métodos como punción, estrías, extensión en superficie, etc.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

6.0 RECURSOS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS

6.1 EQUIPOS

- Cabina de seguridad biológica tipo IIA
- Incubadora (Rango de uso 36+/-1°C)
- Microscopio
- Autoclave
- Nevera (Rango de uso 2-8°C)
- Balanza analítica

6.2 INSUMOS

- Asas calibradas estériles
- Tubos de vidrio con tapa
- Cajas de Petri
- Hisopos estériles.
- Laminas porta objetos.
- Laminillas cubreobjetos
- Pinzas.
- Toallas desechables.
- Cinta de enmascarar
- Regla para lectura de antibiograma
- Erlenmeyer
- Probetas
- Asas Bacteriológicas
- Asas micológicas
- Vela
- Mechero
- Cámara de anaerobiosis

6.3 REACTIVOS

- **Medios de cultivo:**
- Agar Sangre.
- Agar Chocolate.
- Agar Sabouraud.
- Agar Mc Conkey
- Agar Mueller Hinton
- Caldo BHI.
- Agar Salmonela-Shiguella.
- Agar tetrationato.

Reactivos:

- Glicina

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Cloruro de sodio.
- Agua destilada o desionizada.
- Solución violeta de Gram
- Solución Lugol de Gram.
- Solución alcohol acetona de Gram
- Solución fucsina de Gram.
- Aceite de inmersión.
- Azul de lactofenol.
- Solución salina estéril en tubos.
- Plasma sanguíneo con EDTA
- Kits comerciales de pruebas bioquímicas para identificación bacteriana
- Agua oxigenada
- Pruebas de oxidasa

Sensidiscos de antibióticos:

- Ácido nalidíxico.
- Aminoglucósidos
- Betalactámicos
- Quinolonas
- Cefalosporinas (generaciones 1,2 y 3)
- Macrólidos.

6.4 MATERIAL DE REFERENCIA

- Cepas bacteriológicas de referencia (Gram positivo y Gram negativo).

6.5 ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL:

- Careta
- Guantes de látex
- Tapabocas
- Zapato blanco
- Uniforme
- Gorro
- Bata blanca

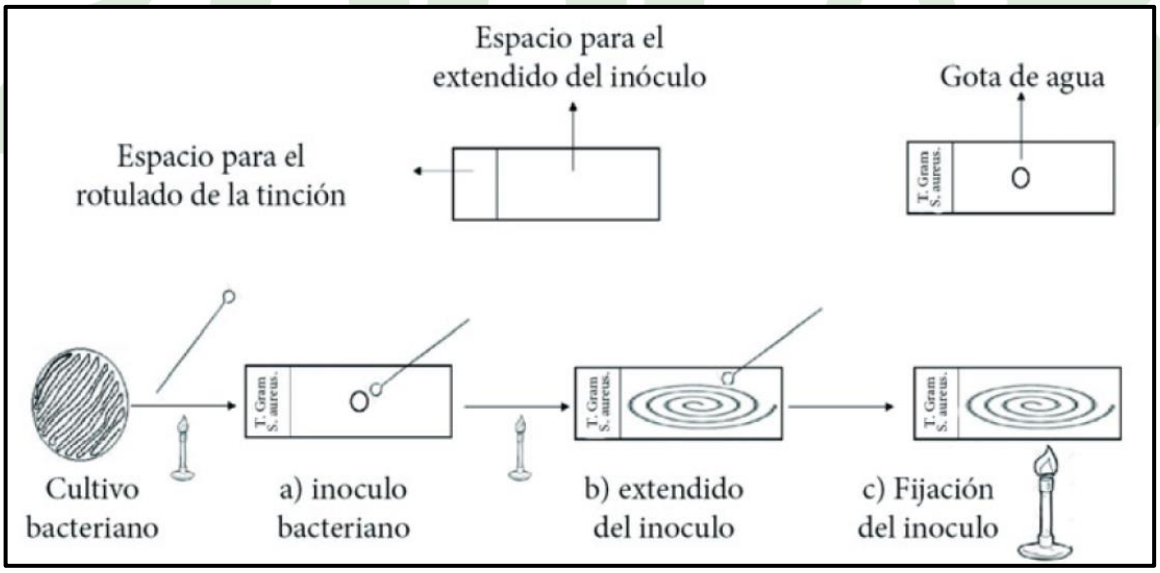
La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

7 MORFOLOGÍA BACTERIANA Y TINCIONES

Las bacterias son microorganismos incoloros y pequeños, por tal razón, sólo es posible observarlos mediante un examen microscópico. cuando se requiere conocer a detalle su morfología, es necesario recurrir a los reactivos necesarios para que sean fijadas y teñidas. Estas tinciones ofrecen algunas ventajas como, por ejemplo: aumentan el contraste entre la célula bacteriana y el medio que la rodea, permiten distinguir diferentes tipos de células bacterianas según sea su capacidad de teñirse con cualquier colorante y permiten establecer la morfología de la célula bacteriana y de otros microorganismos, su agrupación y también algunas estructuras específicas. Este tipo de preparaciones se basa en los siguientes procedimientos:

EXTENSIÓN: Consiste en depositar asépticamente, en el centro de un portaobjeto, una gota de solución salina y, con ayuda del asa de siembra, extraer el inóculo desde un cultivo bacteriano, luego se procede a expandir el inóculo junto con la gota de agua sobre la superficie del portaobjeto de manera uniforme.

FIJACIÓN: Después de extendidas, las bacterias se deben adherir al portaobjeto en el cual se van a teñir; la fijación por calor es lo más común (método físico a través de la llama del mechero para inducir la muerte celular y adherirlas al portaobjeto), pero también se recurre a compuestos químicos como formaldehído y alcoholes (método químico).



Procedimiento para la obtención y fijación de un frotis bacteriano.

TINCIÓN: Una vez fijada la muestra, se hace uso de los colorantes, la mayoría de ellos son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los componentes celulares.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Las tinciones pueden ser:

- **Simples:** Utilizan un solo colorante. Se basan en el hecho de que la célula tiene una composición química diferente a la de su entorno, por ende, ambos se comportan de manera distinta frente a un colorante.

- **Compuestas o Diferenciales**: Son capaces de diferenciar estructuras o incluso microorganismos que poseen características superficiales específicas y, por lo tanto, reaccionan diferente frente a una tinción, por ejemplo, la tinción de Gram y la tinción de Ziehl Neelsen.

Los colorantes pueden ser de distintos tipos:

- Catiónicos o Básicos: Son aquellos que tienen cargas positivas y se combinan fuertemente con los componentes celulares cargados negativamente, como lo son los ácidos nucleicos, polisacáridos ácidos, y la mayoría de las superficies celulares como, por ejemplo: el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina.

- Aniónicos o Ácidos: Son aquellos que poseen carga negativa, no penetran el interior celular, solo tienen la capacidad de teñir su entorno, como, por ejemplo: la eosina.

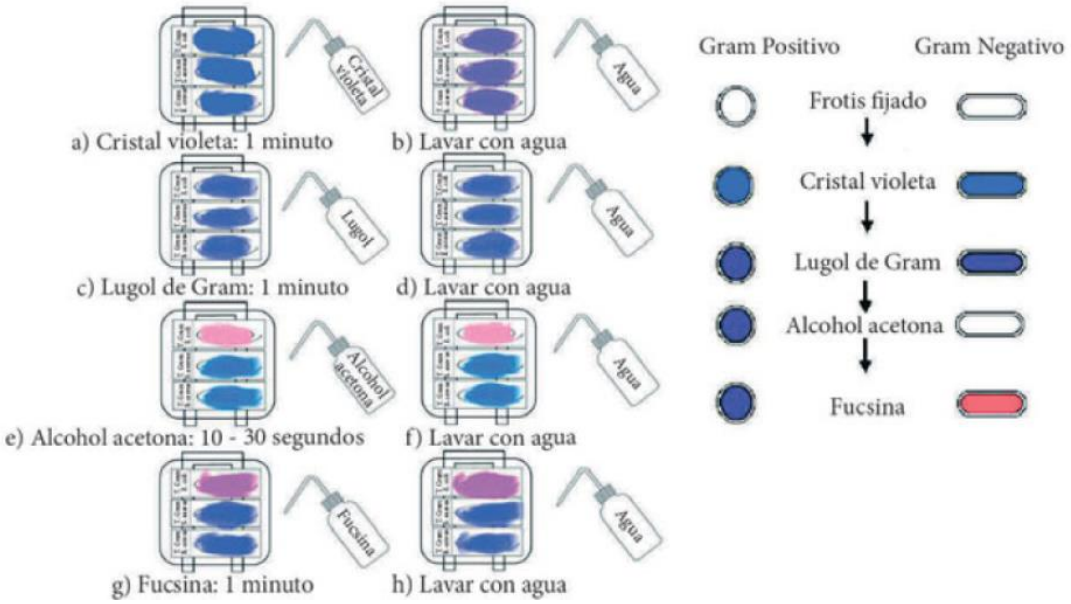
- Liposolubles: Se mezclan con los lípidos celulares y los tiñen, por ejemplo: Negro Sudán (diferenciación de leucemias)

7.1 TINCIÓN DE GRAM

Es un tipo de tinción especial usada para la diferenciación de morfología bacteriana. Se utilizan 4 colorantes que tienen afinidad a la pared bacteriana. El **cristal violeta** es el primer colorante utilizado, tiene afinidad por el peptidoglicano y teñirá de morado todas las bacterias presentes, posteriormente se coloca el **Lugol** que inducirá la formación de complejos insolubles de cristal violeta-yodo-proteínas ribonucleares dentro de la célula. Las bacterias Gram positivas, al tener una pared gruesa de peptidoglicano, forman más complejos (cristal violeta-yodo), por tanto, retienen el colorante. Además, también influye que la pared de las bacterias Gram positivas contienen mayor cantidad de ácidos no saturados, los cuales muestran gran afinidad por los agentes oxidantes (Lugol).

Por el contrario, las bacterias Gram negativas, poseen una capa delgada de peptidoglicano, lo que hace que formen menos complejos. Posteriormente se realiza la decoloración, donde las bacterias Gram positivas y Gram negativas se comportan de manera diferente. Las bacterias Gram negativas contienen una membrana externa rica en lipopolisacáridos (LPS), que forma parte de su pared celular. Las grasas son destruidas por el contacto con el **alcohol acetona**, por lo que la membrana externa se desestabiliza, siendo liberado el cristal violeta. Es así como luego es contra teñida con la **safranina o fucsina básica**, tomando el color fucsia. En el caso de las bacterias Gram positivas, resisten la decoloración porque el decolorante actúa cerrando los poros, lo que impide que el complejo cristal violeta/yodo pueda salirse. Por lo tanto, se mantiene estable la coloración con el cristal violeta, y no hay cabida para la safranina o la fucsina. Por esto, se tiñen de azul intenso o morado.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



Pasos para la realización de una Tinción de Gram.

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Fluidos, secreciones, excreciones de cualquier especie animal.	~~Determinación~~ Identificación de ~~gérmenes~~ bacterias Gram Positivas y/o ~~gérmenes~~ Gram Negativas en muestras biológicas de fluidos, secreciones, excreciones. Extendido y Tinción	Coloración de Gram.	Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas.	20 minutos.

Nota: **NO OLVIDE MARCAR LAS LÁMINAS PORTAOBJETOS QUE UTILICE DURANTE LA PRUEBA**

- Revisión e identificación de la muestra con el número correspondiente
- Realizar el extendido sobre una lámina portaobjetos de la secreción y/o cultivo.
- Fijar el extendido con el mechero.
- Cubrir la lámina por 60 segundos con Cristal Violeta.
- Eliminar el exceso de colorante y lavar rápidamente con agua, manteniendo el portaobjeto en posición inclinada.
- Cubrir la lámina por 60 segundos con Lugol de Gram.
- Lavar nuevamente con agua.
- Cubrir la lámina por 30 segundos con Alcohol - Acetona de Gram.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Lavar con agua.
- Cubrir la lámina por 60 segundos con Fucsina de Gram.
- Lavar con agua, secar y observar a inmersión (100X).
- Consignar lo observado en el LBFMT031 Registro de Microbiología.

CONTROL DE CALIDAD DE COLORANTES

Por cada reactivo nuevo, debe realizarse un control del lote, con la cepa de control microbiológico según el procedimiento de la tinción mencionada anteriormente y el resultado debe registrarse en LBFMT090 control de colorantes.

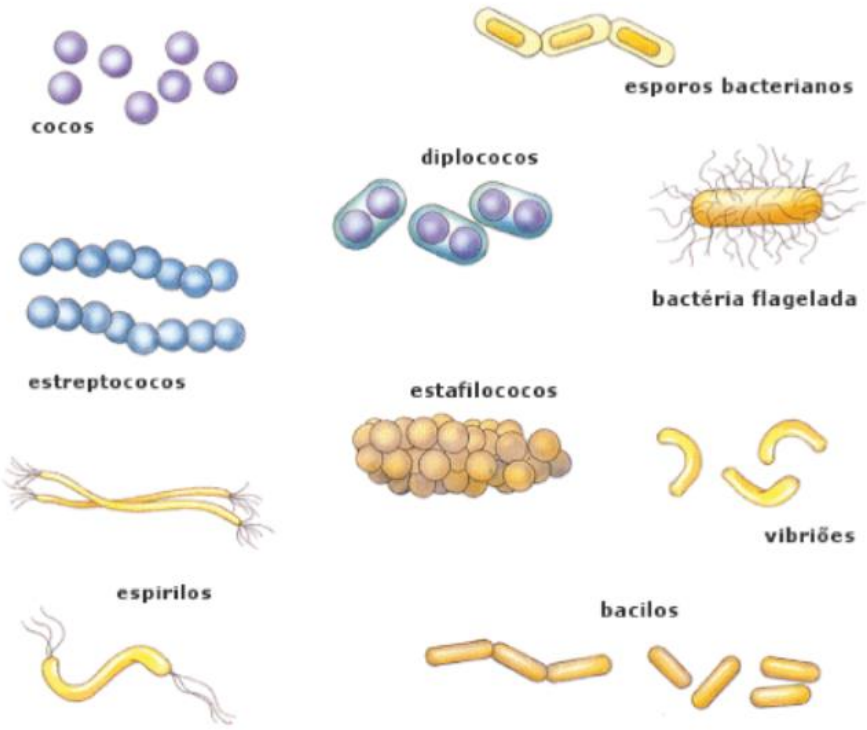
MORFOLOGÍA BACTERIANA

Con la visualización de las bacterias utilizando tinciones especiales se puede obtener información importante que puede ser utilizada en la identificación de una bacteria. Se puede determinar la morfología microscópica definiendo la forma, el tamaño y modo de agrupación de las mismas.

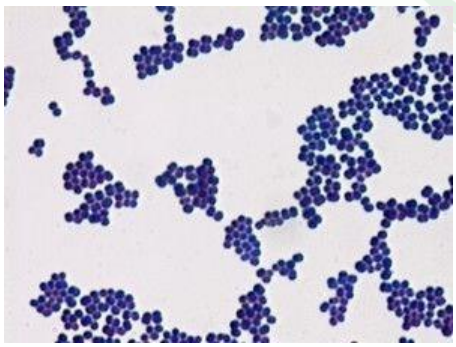
Las bacterias tienen principalmente tres formas: esféricas (cocos); cilíndricas o en forma de bastón (bacilos) y en espiral o helicoidal (espirilos).

- **COCOS**: Son bacterias esféricas que presentan diferentes tipos de agrupaciones, éstas dependen de la división celular. Cada agrupación es propia de distintos géneros, por lo cual, es útil para la identificación, aunque no definitiva por lo cual es necesario realizar pruebas bioquímicas específicas para la determinación del género y la especie. Por ejemplo, Neisseria spp. está conformada por parejas de cocos en cadenas; Streptococcus spp. está conformado por cocos en cadenas; Staphylococcus spp. está conformado por racimos.
- **BACILOS**: Son bacterias en forma de bastones, varían según su tamaño, longitud y diámetro, no suelen presentar agrupaciones, sin embargo, se pueden observar en cadena o en pares.
- **ESPIRILOS:** Son bacterias con morfología helicoidal o en espiral, éstas predominan como células aisladas o individuales.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

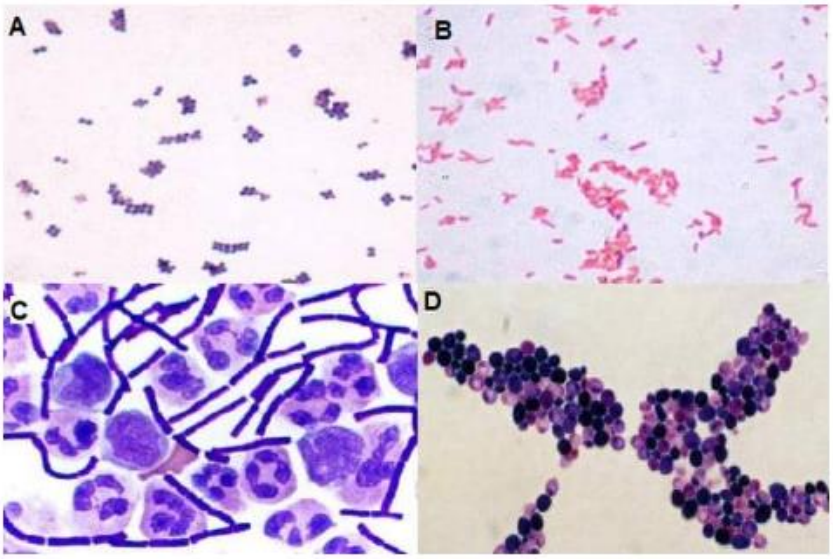


Morfología y agrupación bacteriana.

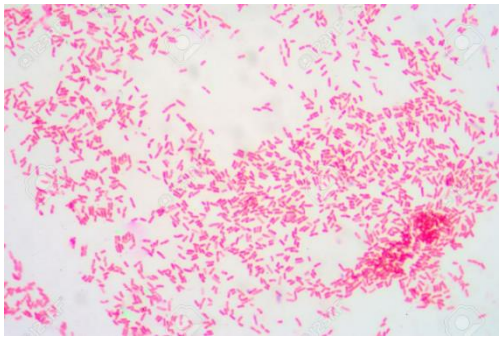




La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



Diversos extendidos teñidos con tinción de Gram. A. Cocos Gram positivos. B. Bacilos Gram negativos. C. Bacilos Gram Positivos, polimorfonucleares y mononucleares. D. Levaduras.





La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

8 MEDIOS DE CULTIVO

Las bacterias necesitan nutrientes apropiados junto con condiciones ambientales favorables para un óptimo crecimiento. Existen y se utilizan una gran variedad de medios de cultivo cuya composición varía de acuerdo con las necesidades nutricionales de los organismos que se pretende estudiar. Así, el trabajo de aislamiento en cultivo puro de una especie dada puede facilitarse con ayuda de medios de cultivos que aprovechan alguna característica particular para sus exigencias nutricionales, aparte de considerar otros requerimientos como la temperatura, grado de humedad, el oxígeno, el pH, etc. (Gómez y Batista, 2006). Los medios de cultivos se definen como cualquier preparado, sólido o líquido, que contiene todas las sustancias nutritivas para el desarrollo de las bacterias. Este debe ser estéril y estar protegido de la contaminación ambiental (Valenzuela, 2007).

8.1 CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se han clasificado de acuerdo a su estado físico y utilización.

Según su estado físico:

MEDIOS LÍQUIDOS: Comúnmente llamados caldos, se emplean para la homogenización de muestras, realizar diluciones y enriquecimiento del medio de cultivo. Así mismo, son útiles para la activación de cepas microbianas liofilizadas. Por lo general, estos medios suelen servirse en tubos de ensayos. Ejemplos: caldo tetrationato (recuperación de *Salmonella sp*.), caldo tioglicolato (bacterias anaerobias) y caldo infusión cerebro corazón (BHI).

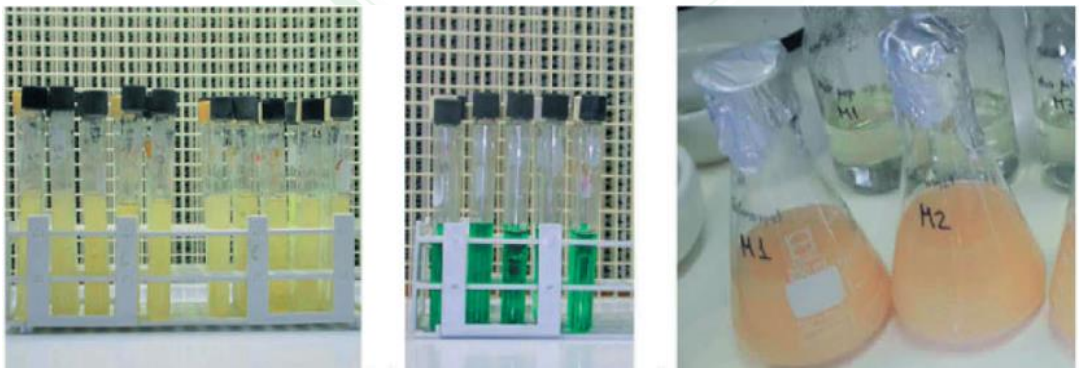


Imagen 4: Medios de cultivo líquido.

MEDIOS SÓLIDOS: Se conocen como agares. Se obtienen a partir de medios de cultivos líquidos a los cuales se les agrega una sustancia solidificante, como por ejemplo agar-agar, gelatina o gel de sílice (los agares no

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

deben confundirse con el agar-agar; este último es solo un agente solidificante y no brinda condiciones nutricionales). Los agares son empleados frecuentemente en placas de Petri o en tubos de ensayos de manera inclinada, y son útiles para el aislamiento de bacterias a través del desarrollo de colonias y mantenimiento de cultivos puros. Ejemplo: agar Sangre, agar Chocolate, agar Sabouraud, agar Mc Conkey, agar Müller-Hinton, agar *Salmonella – Shigella* (SS).

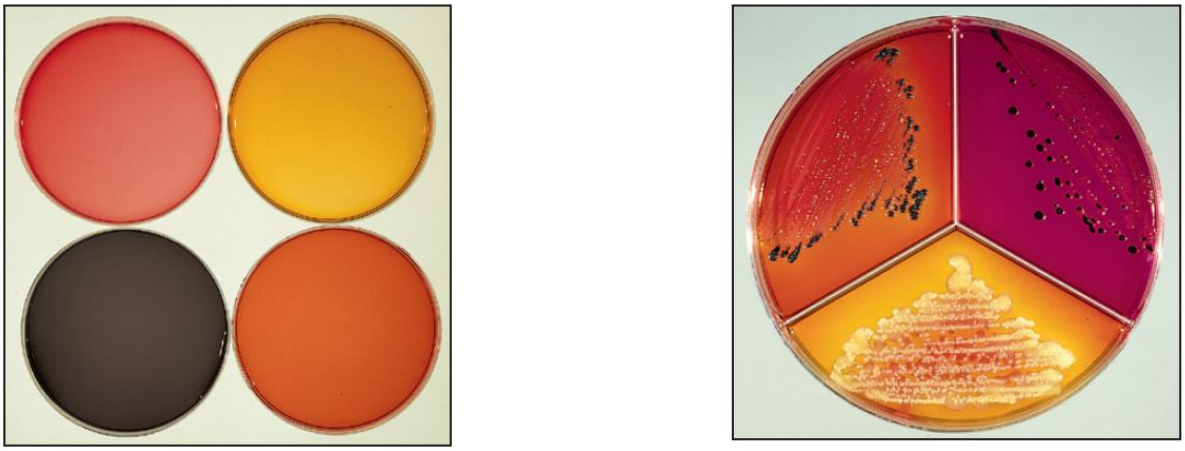


Imagen 5: Medios de cultivo sólidos

Según su utilización:

- **Medios Enriquecidos**: Son medios de cultivos comunes a los que se les agregan ciertos ingredientes que enriquecen su condición nutritiva original. Se emplean para el aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes, por ejemplo: agar sangre, que está constituido de agar peptona más 5% de sangre desfibrinada; el caldo glucosado, que es caldo de peptona enriquecido con 1% de glucosa.

- **Medios Selectivos**: Son aquellos medios que han sido formulados químicamente de tal forma que favorecen el crecimiento de la especie que se desea aislar y al mismo tiempo suprimen el de cualquier otra especie competidora. Se preparan incluyendo generalmente algunas sustancias inhibidoras como antibióticos, sales biliares, etc., por ejemplo: agar *Salmonella – Shigella* (SS).

- **Medios Diferenciales**: Son aquellos que favorecen el aislamiento de una especie dada a partir de un cultivo mixto, permitiendo reconocerla o detectarla a través de una característica bioquímica de valor taxonómico que le es propia: por ejemplo, la hemólisis de glóbulos rojos (en agar sangre), la coagulación del plasma, la fermentación de azúcares a través de cambios de pH que se detectan en el medio (que contienen un indicador de pH adecuado, como azul de bromo timol, rojo fenol, entre otros.

8.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- **No olvide marcar todos los recipientes que utilice durante la prueba.**

- Seguir las instrucciones consignadas en cada recipiente de medio de cultivo, de acuerdo con la casa comercial fabricante como se muestra en la Tabla 1.

MEDIO	CANTIDAD A PREPARAR	GRAMOS DEL MEDIO	ADICION SUPLEMENTO	ESTERILIZACIÓN	ESPECIFICACIONES
Agar Sangre y Chocolate	100 ml (5 cajas) 200 ml (10 cajas) 300 ml (15 cajas) 400 ml (20 cajas) 500 ml (25 cajas)	4 gr 8 gr 12 gr 16 gr 20 gr	5 ml sangre desfibrinada 10 ml sangre desfibrinada 15 ml sangre desfibrinada 20 ml sangre desfibrinada 25 ml sangre desfibrinada	SI (15 Min.) 121°C	Agar Sangre: Dejar enfriar el medio y agregar la sangre. Agar Chocolate: Adicionar la sangre inmediatamente el medio sale del autoclave
Agar Mc Conkey	100 ml (5 cajas) 200 ml (10 cajas) 300 ml (15 cajas) 400 ml (20 cajas) 500 ml (25 cajas)	5,15 gr 10,3 gr 15,45 gr 20,6 gr 25,75 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	51,5 gr en 1Litro
Müller-Hinton	100 ml (5 cajas) 200 ml (10 cajas) 300 ml (15 cajas)	3,8 gr 7,6 gr 11,4 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	38 gr en 1Litro
Agar Sabouraud	100 ml (5 cajas) 200 ml (10 cajas) 300 ml (15 cajas)	6,5 gr 13 gr 19,5 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	65 gr en 1Litro
Agar Salmonella - Shigella	100 ml (5 cajas) 200 ml (10 cajas) 300 ml (15 cajas)	6 gr 12 gr 18 gr	NO	NO. LLEVAR A EBULLICIÓN Y SERVIR.	60 gr en 1 Litro
Caldo BHI	100 ml (10 tubos) 200 ml (20 tubos) 300 ml (30 tubos) 400 ml (40 tubos) 500 ml (50 tubos)	3,7 gr 7,4 gr 11,1 gr 14,8 gr 18,5 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	37 gr en 1 Litro
Caldo Tetrationato	100 ml (10 tubos) 200 ml (20 tubos) 300 ml (30 tubos) 400 ml (40 tubos) 500 ml (50 tubos)	4,6 gr 9,2 gr 13,8 gr 18,4 gr 23 gr	NO	NO. LLEVAR A EBULLICIÓN, ENFRIAR (45°C) ADICIONAR EL SUPLEMENTO Y SERVIR.	46 gr en 1 Litro
Caldo Tioglicolato	100 ml (10 tubos) 200 ml (20 tubos) 300 ml (30 tubos) 400 ml (40 tubos) 500 ml (50 tubos)	2,9 gr 5,8 gr 8,7 gr 11,6 gr 14,5 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	29 gr en litro
Agar semisolido NaCl 6,5%	100 ml (10 tubos) 200 ml (20 tubos)	2,5 gr BHI - NaCl 6,5 gr - Agar 1,5 gr. 5 gr BHI - NaCl 13 gr - Agar 3 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	BHI 25 gr en litro Cloruro de sodio 65 gr en litro Agar 15 gr en litro

Tabla 1: Preparación de medios de cultivo.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Todos los agares deben ser hervidos antes de esterilizarse y que una vez esterilizados deben dispensarse rápidamente en las cajas de Petri.

- **AGAR SANGRE:** Una vez esterilizado el medio esperar a que alcance temperatura de 45°C y agregar sangre de cordero al 5%, homogenizar y servir inmediatamente.

- **AGAR CHOCOLATE**: una vez esterilizado esperar a que el medio alcance temperatura de 80°C y agregar sangre de cordero al 5%, homogenizar y servir inmediatamente.

- **AGAR PRUEBAS DE MOTILIDAD**: Se prepara con los siguientes reactivos: BHI CALDO (37g), agua destilada (1l), agar agar (4g), ajustar el pH a 7,4+/- 0,2. Esterilizar y servir, finalmente asignar lote.

- Cada vez que se preparen medios de cultivo debe asignarse un lote para cada medio preparado de la siguiente manera: diligenciarse el registro de lote y control de medios de cultivo LB-FMT 039.

  Para asignar el lote, las letras iniciales de los medios de cultivo son:

  - ✓ Agar Sangre (A-S).
  - ✓ Agar Chocolate (A-Ch).
  - ✓ Agar Sabouraud (A-Sb).
  - ✓ Agar Mc Conkey (A-McC).
  - ✓ Agar Mueller Hinton (A-MH).
  - ✓ Caldo BHI (C-BHI).
  - ✓ Ellinghausen - McCullough – Johnson – Harris (EMJH)
  - ✓ Agar Sal*monela-Shiguella* (A-SS).
  - ✓ Agar motilidad (A-M).

- Además de las iniciales, se agrega la fecha de preparación. (AAMMDD).

- Registrar el control de preparación de medios y el lote en el formato LBFMT039 (Lote y Control de medios de cultivo).

8.3 CONTROL DE CALIDAD- PRUEBA DE ESTERILIDAD

Por cada lote preparado se incubará una muestra de éste a 36-38°C por 24 horas. Esto con el fin de confirmar esterilidad del medio y se espera que no exista crecimiento alguno, de no ser así todo el lote debe ser eliminado.

8.4 CONTROL DE CALIDAD- PRUEBA DE FUNCIONAMIENTO

Por cada lote preparado se debe realizar la siembra de cepas de referencia disponibles. Se tiene que evidenciar crecimiento en los medios pertinentes, de no ser así todo el lote debe ser eliminado.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

8.5 AMBIENTES DE CULTIVO

Cada cepa o especie bacteriana tiene temperatura óptima de crecimiento y concentraciones de oxígeno requeridas para su desarrollo. En el laboratorio se pueden utilizar para el aislamiento primario de los microorganismos:

8.5.1 AEROBIOSIS

Consiste en tener presencia de oxígeno (21 %), nitrógeno (78 %), y otras sustancias (1 %), como ozono, dióxido de carbono, hidrógeno y gases nobles (como kriptón y argón). Este ambiente se logra con el oxígeno ambiental, es decir la incubación se realiza colocando las placas en posición invertida en la incubadora.



Imagen 6: Incubadora.

8.5.2 MICROAEROFILIA

Consiste en tener un ambiente con disminución en la cantidad de oxígeno. Se puede lograr a través de los siguientes métodos:

Jarra con vela: Para esto se introducen los medios de cultivo inoculados dentro de una campana, se enciende una vela dentro de la campana y se cierra la tapa, vigilar hasta que se apague la vela. La combustión de la vela aporta una atmósfera aproximada de 17-19% de oxígeno y de 2-4% de dióxido de carbono.

Generadores caseros: reduce la atmósfera de oxígeno por consumo en reacción química y aumenta la de dióxido de carbono por medio de la disolución de bicarbonato en agua. Entre estos tenemos: una pastilla de boranato de sodio (0,8 gr para una jarra de 3 litros), una pastilla de Alka Seltzer en 10 ml de agua destilada. Introducir los componentes mencionados dentro de una campana junto con los cultivos inoculados. Cerrar la campana.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

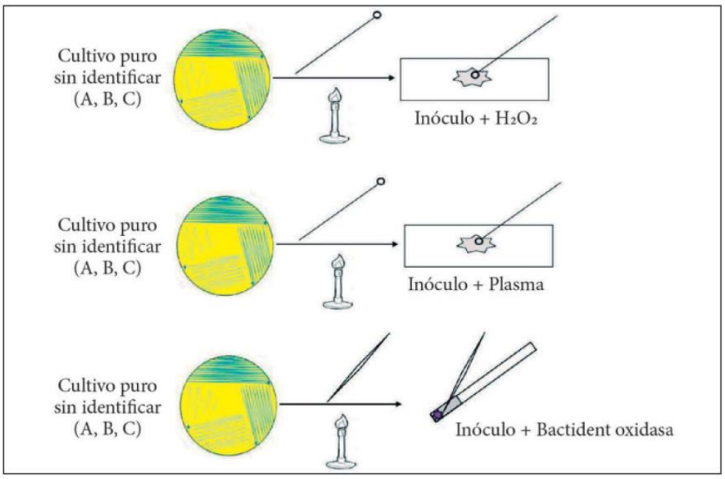
Sobres comerciales para microaerofilia: Introducir los sobres dentro de una campana junto con los cultivos inoculados.



Imagen 7: Cámara de microaerofilia.

9. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN

enzimáticas. a) Catalasa, b) Coagulasa, c) Oxidasa.



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Son una serie de análisis que sirven para determinar los procesos metabólicos de una cepa pura de microorganismo y así poder identificar familia y especie de este. Estas se realizan en diferentes medios de cultivo, los cuales son selectivos y tienen indicadores que permiten determinar la reacción bioquímica.

COCOS GRAMPOSITIVOS (*Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus*).

Crecen en medios de enriquecimiento como el agar sangre en donde se observan diferentes colonias:

Staphylococcus aureus: Son cocos Gram positivos, las pruebas de catalasa y coagulasa son positivas. Se identifican porque sus colonias tienen un tamaño aproximado de 2 a 3 mm, son lisas, amarillas con presencia de beta hemolisis y se agrupan en racimos. En el caso de los aislados que son positivos a la coagulasa, esta suele observarse por la técnica de lámina donde se evidencia un precipitado granular o formación de grumos blancos a los 15 o 20 segundos, si estos se presentan después de los 2 minutos, la prueba se considera negativa.

Otros *Staphylococcus* no hemolíticos: son cocos Gram positivos, las pruebas de catalasa positiva y coagulasa negativas. Se identifican porque sus colonias tienen un tamaño aproximado de 1 a 2 mm, son lisas de color blanco y no presentan hemolisis, se agrupan en racimos.

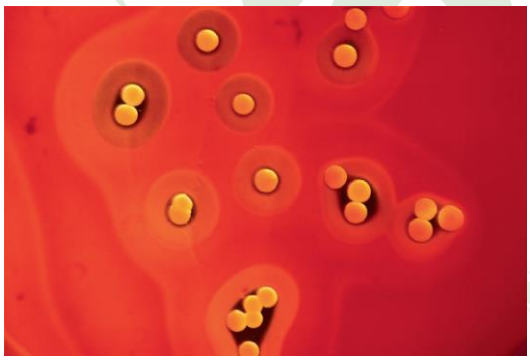
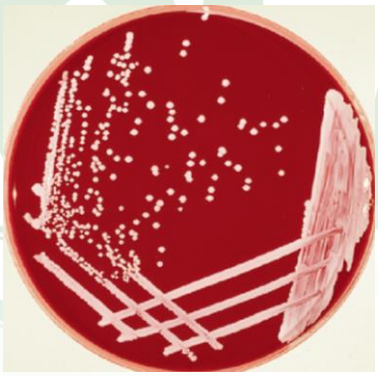
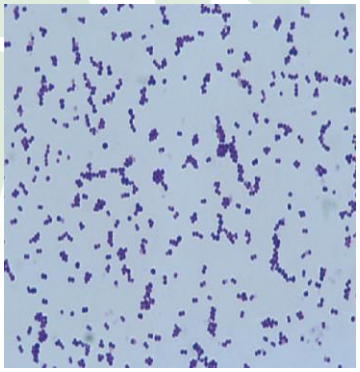
 Colonias de *S. aureus* en agar sangre	 *S. hyicus* en agar Sangre.	 *S. aureus* en tinción de gram.

Tabla 2: Características morfológicas de *Staphylococcus*.

Catalasa: Es una enzima que desdobla el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. El H_2O_2 es el producto final del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono (azúcar); la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas son catalasa +. Esta prueba permite le diferenciación entre *Staphylococcus* y *Streptococcus.*

- ✓ Técnica en lámina: Agregar en la lámina portaobjetos 1 o 2 gotas de H_2O_2, tomar una colonia con un asa previamente esterilizada y mezclarla. La prueba se interpretará como positiva si aparecen

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

instantáneamente y de manera continua burbujas o efervescencia.



Coagulasa: Es una enzima proteolítica capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible. Esta prueba permite le diferenciación entre *Staphylococcus aureus* – *S.pseudintermedius* de los *Staphylococcus* no hemolíticos. Existen 2 formas de realizarla:

- Coagulasa fija: Factor de coagulación unido a la pared de la bacteria y se detecta mediante prueba de lámina.
- Coagulasa libre: Se encuentra presente en los filtrados de cultivo y se detecta mediante prueba en el tubo.

✓ Técnica en lámina: Colocar una gota de solución salina fisiológica (SSF) y suspender en ésta una colonia con el asa bacteriológica estéril, mezclar bien y agregar una gota de plasma **no suero**. La prueba se interpretará con la aparición precipitados granulares o formación de grumos blandos de 15 a 20 segundos indicando que la prueba es positiva. Si se observa aglutinación después de los 2 minutos, la prueba se considera negativa.

✓

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

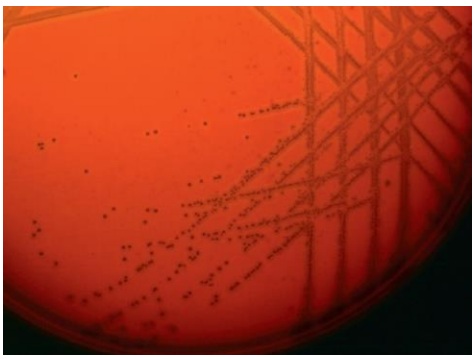


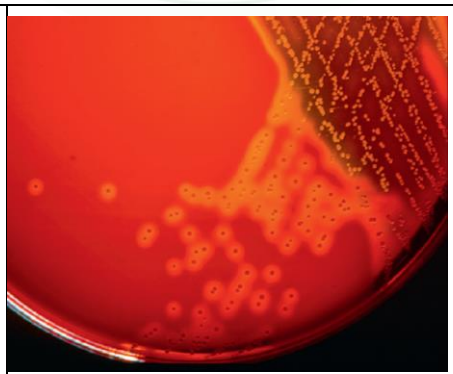
Streptococcus* y *Enterococcus: Los estreptococos y enterococos son cocos Gram positivos que se presentan solos, en parejas o en cadenas de longitudes variables. Cada coco tiene menos de 2 µm de diámetro y puede tener un aspecto esférico u ovoide. Son anaerobios facultativos, catalasa-negativos, oxidasa-negativos y no móviles con la excepción de algunos enterococos.

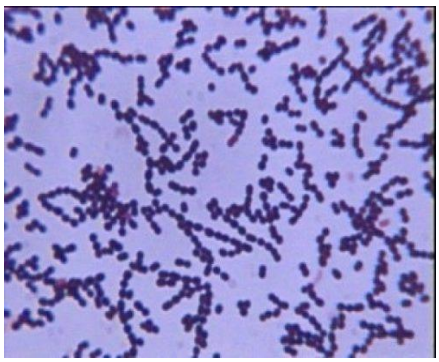
Los estreptococos son muy exigentes y requieren la adición de sangre o suero a los medios para crecer. Los enterococos toleran las sales biliares en el agar McConkey y aparecen como pequeñas colonias puntiformes en este medio. El tipo de hemólisis producido por una especie de estreptococo puede ser variable. Los principales tipos de hemólisis son:

- (β) Hemólisis beta: una zona clara de hemólisis alrededor de la colonia.
- (α) Hemólisis alfa: una zona de color verdoso o de hemólisis parcial.
- (γ) Hemólisis gamma: no hay hemólisis.

En general, los estreptococos beta-hemolíticos suelen ser los más patógenos en medicina veterinaria.


Colonias de *Streptococcus* en agar sangre. (Alfa hemólisis).


Colonias de *Streptococcus* en agar sangre. (Beta hemólisis).


Streptococcus en tinción de gram.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Tabla 3: Características morfológicas de *Streptococcus*.

Tolerancia al NaCl al 6.5 %: Sirven para la diferenciación entre *Streptococcus* y *Enterococcus* los cuales crecen en medios con alto contenido salino.

- ✓ Técnica: Inocular en el tubo con el NaCl el microorganismo, incubar a 37°c por 24 a 48 horas. La interpretación se realiza con la presencia de turbidez por el crecimiento bacteriano.
- ✓

COCOS GRAMNEGATIVOS (Neisseria sp. y Moraxella sp).

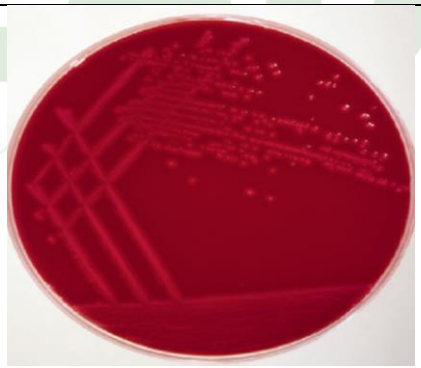
Crecen en medios de enriquecimiento como el agar sangre y chocolate; las pruebas de catalasa y oxidasa son positivas.

***Neisseria sp*:** Se identifican porque sus colonias son pequeñas con bordes circulares, translucidas y brillantes, de coloración gris, sin presencia de hemolisis y se agrupan en diplococos.

***Moraxella sp*:** Se identifican porque sus colonias son planas, redondas pequeñas de color blanco-grisáceo y en las principales especies que afectan animales están rodeadas de una estrecha zona de hemolisis; se agrupan en diplococos.

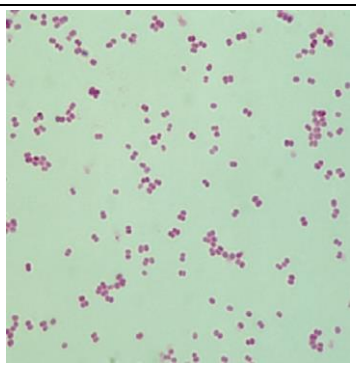


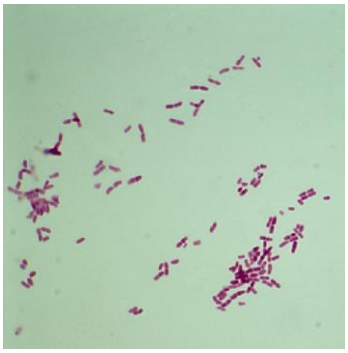
Colonias de Neisseria en agar sangre.



Colonias de Moraxella en agar sangre (Beta-hemólisis)

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión





En la figura de la izquierda *Neisseria sp.* en la figura de la derecha *Moraxella sp* en tinción de gram.

Tabla 4: Características morfológicas de *Neisseria sp*. y *Moraxella sp.*

Sensibilidad a la penicilina: Es una prueba utilizada para caracterizar a ciertos microorganismos por su sensibilidad o resistencia frente a una sustancia antimicrobiana. Esta prueba permite le diferenciación entre estas dos especies de diplococos.

- ✓ Técnica: Hacer una suspensión de las colonias en 1 ml de PBS 1X a una escala 5 de MacFarland. Sembrar masivamente con un hisopo estéril en el medio Mueller Hinton. Esterilizar la pinza, tomar el disco de Penicilina 10 U, colocar en el centro del medio haciendo un poco de presión. Incubar 37 °C por 18 a 24 horas.

Si se observa un halo de inhibición igual **o menor 26 mm** se considera resistente, característica de las colonias de ***Moraxella sp***, las cuales tiene producción de betalactamasas.

Si se observa un halo de inhibición **mayor a 26 mm** se considera sensible, característica de las colonias de ***Neisseria sp*.** Algunas cepas pueden presentar sensibilidad intermedia.

Como prueba adicional se recomienda realizar un Gram de las colonias crecidas cerca del borde de inhibición del disco de penicilina donde se evidencia un cambio en la morfología de *Moraxella sp* a bacilos Gram negativos.

9.1 FUNDAMENTO PRUEBAS API 20 E.

9.1.1 Voges-Proskauer

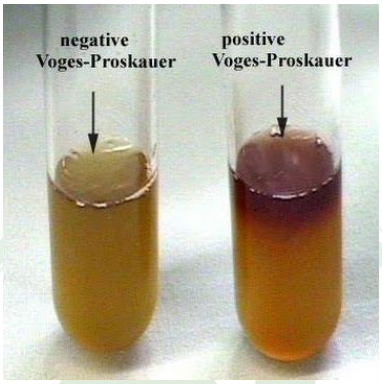
Esta prueba se realiza para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa con producción de un producto final neutro (acetoina) por la vía 2,3 butilenglicol.

- Sembrar, en el medio RM/VP, con un asa, un inóculo del microorganismo procedente de un cultivo
- Incubar a 37°C durante 48 horas
- Agregar de 3 -5 gotas de alfa naftol que intensifica el color.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Agregar 2-3 gotas de hidróxido de potasio al 40%.
- Dejar reposar 5 minutos y observar la reacción.

- **Interpretación:**
- La aparición de un halo rojo a vino tinto indica una reacción positiva y si no se evidencia aparición de color indica una reacción negativa.



En el medio RM/VP, además de poderse revelar el test de Voges-Proskauer, también se puede revelar la prueba de rojo de metilo.

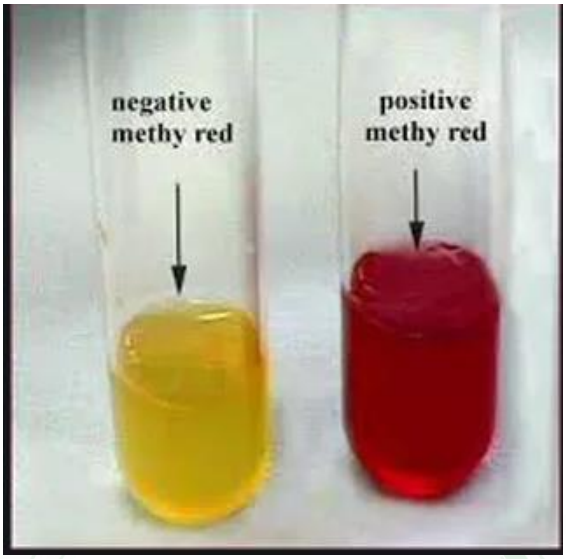
9.1.2 Rojo de Metilo

Se realiza para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa con producción de ácido por la vía de ácidos mixtos.

Al medio de cultivo una vez sembrado el inóculo:
Agregar de 3-5 gotas de rojo de metilo.
Dejar reposar 5 minutos y observar la reacción.

Interpretación:
La aparición de color rojo indica una reacción positiva y si no se observa ningún color indica una reacción negativa.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



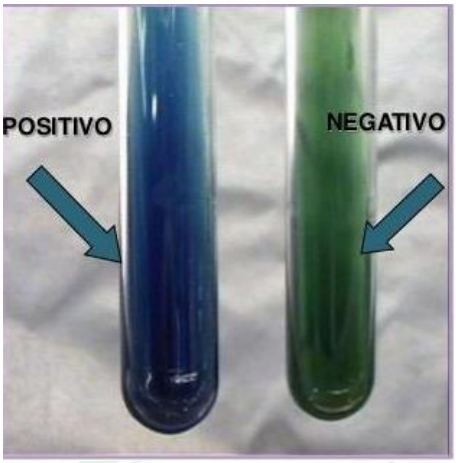
MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO	PRUEBA DEL ROJO DE METILO	PRUEBA DE VOGES PROSKAUER
Escherichia coli ATCC 25922	Satisfactorio	+	-
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Satisfactorio	-	+
Proteus mirabilis ATCC 43071	Satisfactorio	+	-
Salmonella typhimurium ATCC 14028	Satisfactorio	+	-
Enterobacter cloacae ATCC 13047	Satisfactorio	-	+

9.1.3 Prueba de Citrato

Esta prueba identifica si la bacteria es capaz de utilizar el carbono como fuente de energía. No se necesita adicionar reactivos, el medio tiene un indicador que es azul de bromo timol.

Interpretación: el cambio de color de verde a azul indica una reacción positiva, si no hay cambio de color indica una reacción negativa.

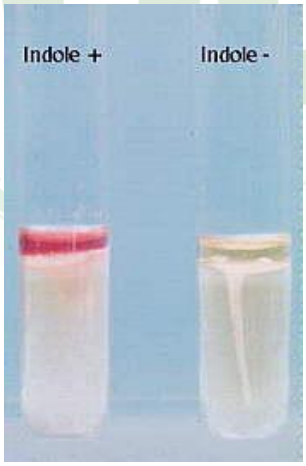
La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



9.1.4 Prueba del Indol

Esta prueba determina la habilidad del microorganismo de romper el indol del aminoácido triptófano. Se utiliza el caldo triptófano o SIM como medio de cultivo.

Interpretación: agregar 3-5 gotas del reactivo de Kovac's. Si el indol está presente se combina con producción de color en la capa del alcohol. La aparición de un color fucsia – rojo indica una reacción positiva, si no se observa la aparición de color indica una reacción negativa.

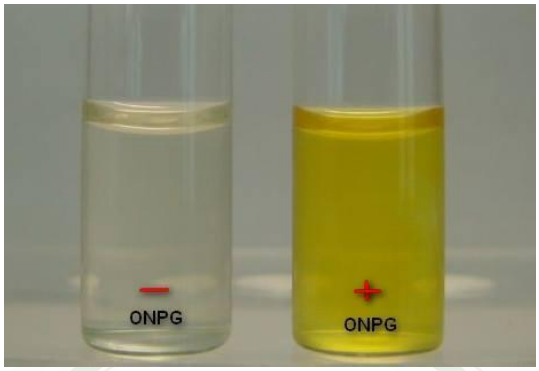


9.1.5 Prueba de O.N.P.G

Determina la ausencia o presencia de la enzima b-galactosidasa mediante el uso del compuesto orgánico o-nitrofenil-b-d-galactopiranosido que al ser hidrolizado produce un compuesto cromógeno amarillo.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

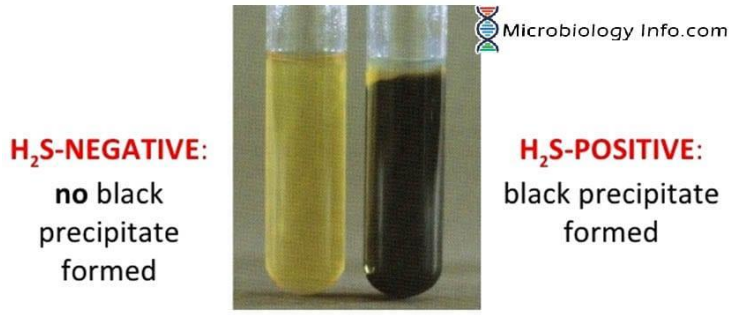
Interpretación: El cambio de color a amarillo indica una reacción positiva, si no hay evidencia de color indica una reacción negativa.



9.1.6 Producción de Ácido Sulfhídrico (H_2S)

- Se determina sembrando con un asa en el medio de cultivo TSI que contiene tiosulfato el cual libera ácido sulfhídrico que es un gas, este reacciona con la sal de hierro y genera un precipitado negro que es el Sulfuro ferroso.
- Los tubos se mantienen por 4 horas a temperatura ambiente.
- La aparición de una coloración negra alrededor del inóculo indica una reacción positiva.
- En caso de duda se incuba a temperatura ambiente o a 37°C, en microaerofilia por 24 – 48h.

I**nterpretación**: Se considera positivo cuando se evidencia formación de coloración negra alrededor del inóculo. Se considera negativo cuando no se evidencia cambio de color alrededor del inóculo.



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

9.1.7 Oxidasa

- La prueba de oxidasa determina la presencia del sistema de citocromo oxidasa. La oxidación se detecta como color azul.
- En la tira reactiva de oxidasa se coloca una colonia.
- El desarrollo de un color lavanda en 10-15 segundos se considera positivo.
- Si no se evidencia desarrollo de color se considera una prueba negativa.

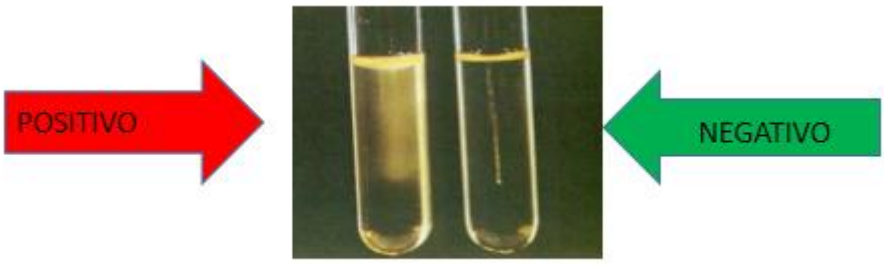


9.1.8 Motilidad

- En un tubo con agar motilidad inocular una colonia con el asa recta de forma vertical.
- Incubar el tubo verticalmente a 36-38ºC por 24 horas en atmósfera de microaerofilia.

Interpretación:

Positivo: Crecimiento difuso alrededor de la línea de inoculación.
Negativo: Crecimiento únicamente en la línea de inoculación



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

9.2 KITS COMERCIALES DE IDENTIFICACIÓN CON PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se utilizan kits comerciales que vienen con las pruebas bioquímicas ya establecidas. Después de la incubación se le añaden algunos reactivos reveladores y se leen las reacciones bioquímicas, donde el código obtenido genera la identificación del microrganismo. Se recomienda siempre leer el inserto para el montaje y seguir sus indicaciones. Entre los kits comerciales usados están: BBL CRYSTAL, ENTERO PLURITEST, ENTEROSYSTEM 18R y API 20E.

A continuación, como ejemplo se ilustra el API 20E.

API 20E

Es un sistema estandarizado que permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes, que incluye 21 test bioquímicos miniaturizados, así como una base de datos.
La galería del sistema API 20 E se compone de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye los test. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos.

La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la Tabla de Lectura, y la identificación se obtiene con la ayuda del Catálogo Analítico o del software de identificación.



Identificación de API20E después de realizar la revelación.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



APOYO DIAGNÓSTICO

9.3 OTRAS PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

9.3.1 Hemólisis

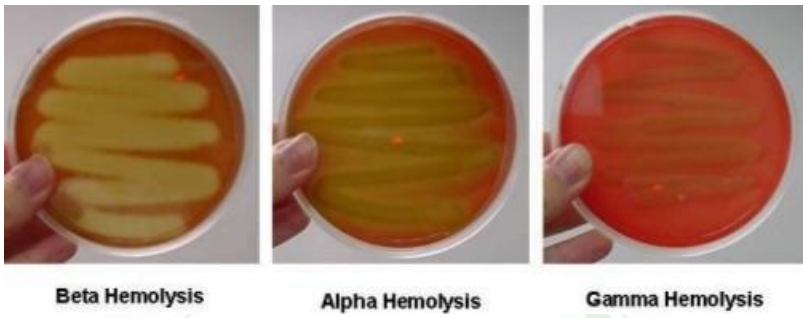
Se utiliza el agar sangre para determinar si el microorganismo tiene unas enzimas llamadas hemolisinas las cuales rompen los glóbulos rojos. La base del agar sangre generalmente suplementada con sangre de cordero, conejo o caballo al 5-10% se usa para aislar, cultivar y estudiar reacciones hemolíticas de una amplia variedad de microorganismos fastidiosos patógenos.

Resultados:

Los *Streptococcus* hemolíticos presentan colonias traslucidas u opacas, grises, pequeñas y mucoides con una zona de hemólisis alrededor de la misma.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Beta hemólisis: hay hemólisis total y se observa la colonia de color amarillo. Ej. *Staphylococcus aureus.*
Alfa hemólisis: hay hemólisis parcial y la colonia se observa de color verde. Ej. *Streptococcus pneumoniae.*
Gamma hemólisis: no hay hemólisis.



9.3.2 Susceptibilidad a Antimicrobianos

- ### 9.3.2.1 Novobiocina

Fundamento: Se basa en que ciertas bacterias son sensibles a la **Novobiocina**.
Procedimiento: Se inocula el microorganismo en agar Mueller Hinton utilizando discos de Novobiocina de 5 microgramos (5 µg), se incuba durante 24 horas a 33° - 35°

Interpretación: Sensible => Inhibición del crecimiento con un diámetro mayor o igual a 16 mm.

Se usa para diferenciar a *Staphylococcus epidermidis* de *Staphylococcus saprofiticus*, donde el primero presenta sensibilidad a este antibiótico y el segundo presenta resistencia.



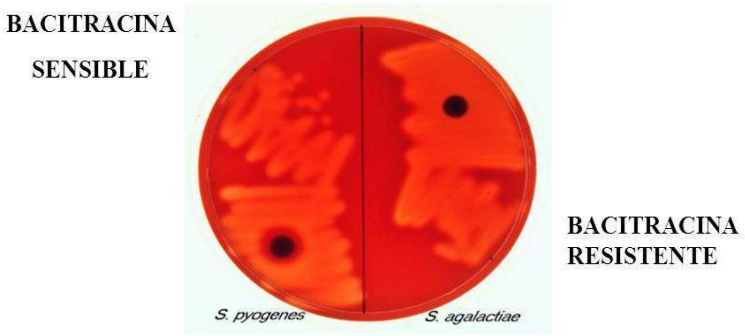
La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- **9.3.2.2 Bacitracina**

Fundamento: Se basa en que ciertas bacterias son sensibles a la **Bacitracina.**
Procedimiento: Se inocula el microorganismo en agar sangre utilizando discos de Bacitracina de 0.04 U. Se incuba durante 18 - 24 horas a 33° - 35° en atmósfera de microaerofilia.

Interpretación: Sensible => Cualquier halo de inhibición del crecimiento se considera positivo.

Se usa para diferenciar a *Streptococcus pyogenes* de *Streptococcus agalactiae*, donde el primero presenta sensibilidad al antibiótico y el segundo presenta resistencia.



- **9.3.2.3 Optoquina**

Fundamento: Se basa en que ciertas bacterias son sensibles a la **Optoquina.**
Procedimiento:
Suspender el microorganismo de un cultivo fresco en solución fisiológica estéril hasta una densidad óptica del tubo 0.5 de la escala de Mac Farland.
Sembrar en forma masiva con hisopo estéril sobre la superficie de una placa de agar sangre.
Colocar con una pinza estéril un sensidisco de Optoquina.
Incubar a 35° por 24 horas en atmósfera de microaerofilia.
Una vez cumplido el tiempo de incubación, observar la presencia o ausencia de halo.

Interpretación: Sensible => Inhibición del crecimiento con un halo mayor a 14 mm. Halos entre 9 y 14 mm deben confirmarse con la prueba de solubilidad en Bilis.

Se usa para diferenciar Streptococcus *pneumoniae* de *Streptococcus viridans*, donde el primero presenta sensibilidad al antibiótico y el segundo presenta resistencia.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



9.3.3.3 Identificación de microorganismos por proteómica – MALDI-TOF

Previo al inicio del desarrollo de la prueba, se requieren los siguientes pasos preliminares:

Previo al uso del equipo

1. Encender el computador y la pantalla. Posteriormente, agregar los datos de usuario y contraseña

Usuario: tof-user
Contraseña: bruker12

2.Encender el equipo MALDI TOF Biotyper
3.Limpiar la junta de goma de la tapa pasando un dedo por la superficie de la junta.



4**.** El módulo porta-tarjetas (porta placa) debe estar dentro del equipo y con la tapa cerrada. En la pantalla del equipo debe aparecerá iluminado el indicador verde “Target Access”.

Limpieza y desinfección placa MSP 96 ref#8280800

Previo al uso de la placa:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

1. Cubrir la placa con etanol (70%) y dejarla cubierta durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Limpiar la placa con agua tipo I o tipo II y secarla con un papel absorbente que no genere motas .
3. Cubrir nuevamente la placa con etanol (70%) y dejarla cubierta durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Limpiar la placa con agua tipo I o tipo II y secarla con un papel absorbente que no genere motas. Verificar que quede completamente seca.
5. Aplicar 100 µl de ácido trifluoroacético (80%) en la placa y frotar toda la placa con una toalla de papel que no genere motas.

Precaución: Nunca manipular el ácido trifluoroacético (80%) ni el material impregnado con este compuesto **sin** guantes.

6. Dejar secar la placa a temperatura ambiente por 30 minutos.

Resuspensión de matriz HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico)

El HCCA viene liofilizado en tubos de 2.5 mg, por lo que antes de usar, se requiere resuspender en solvente que contenga: Acetonitrilo: 50%, agua: 47.5% y ácido trifluoroacético: 2.5%.

Nota: el solvente puede ser adquirido comercialmente. Las marcas recomendadas por Bruker son: Sigma Aldrich (ref: 900666), Honeywell Riedel-de Haen (ref: 19182) y VWR International (ref: PRLS89449.230)

Procedimiento de resuspensión de HCCA

1. Adicione 250 µl de solvente estándar a un tubo de 2.5 ml de matriz liofilizada. Cierre la tapa del tubo verificando que queda completamente cerrado.

2. Agite el tubo en vortex a temperatura ambiente hasta que la totalidad de la matriz se haya disuelto. Preste especial atención a que no se evidencie presencia de cristales.

3.Realice un movimiento manual al tubo para que baje todo el líquido atrapado en la tapa.

Calibración equipo

El equipo cuenta con un extracto de bacteria para la calibrar el equipo, este es denominado “BTS” por sus siglas en inglés (Bacterial Test Standard). El BTS es un extracto de *E. coli* alfa DH5 que muestra un perfil característico de péptidos y proteínas en los espectros de masa de MALDI-TOF. Adicionalmente, contiene extracto de dos proteínas adicionales que extienden el límite superior del rango de masas cubierto por Bruker BTS. El rango de masas total cubierto por el BTS es 3,6 a 17 KDa.
Este procedimiento debe llevarse a cabo cada vez que utilice un frasco nuevo de matriz HCCA.

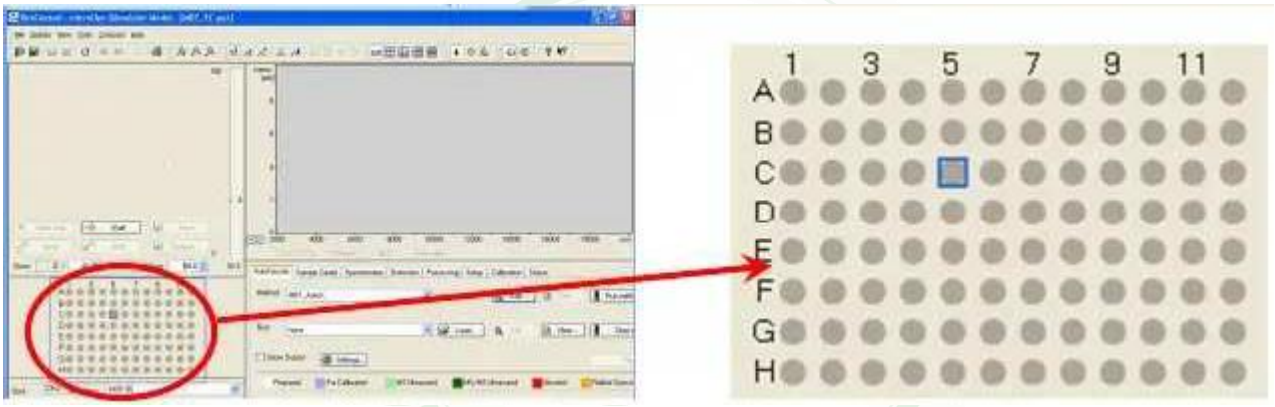
Solubilización y preparación de alícuotas de BTS

1. Agregar 50 µl de solvente al pellet BTS y disolver realizando pipeteo hacia arriba y hacía abajo al menos 20 veces a temperatura ambiente. Evitar la formación de burbujas/espuma.
2. Incubar la solución por 5 minutos a temperatura laboratorio y luego repetir pipeteo del paso anterior.
3. Centrifugar 13000rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Realizar alícuotas de 5 µl de sobrenadante en microtubos de tapa rosca. Cerrar con fuerza.
5. Almacenar alícuotas a -18°C o menos

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

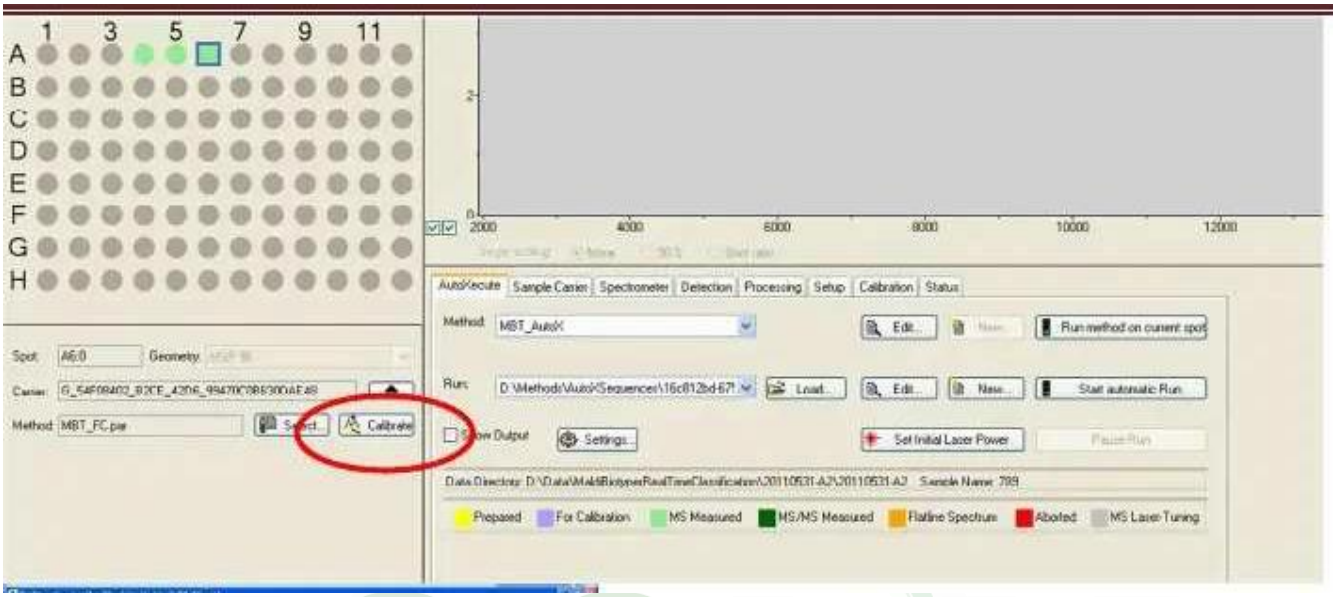
Procedimiento de calibración automática

1. Pipetee 1,0 µl de control BTS en un pozo desocupado de la placa de MALDI y deje secar a temperatura ambiente.
Nota: Una vez usado el BTS, cierre el frasco y confirme que quede herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
2. Añadir 1,0 µl de matriz HCCA al pozo con BTS y dejar secar a temperatura ambiente.
3. Introducir la placa en equipo.
4. En el computador, abrir el programa **Flexcontrol.**
5. En la parte inferior derecha de la ventana del programa aparece el estado del MALDI TOF y de la placa. Esperar a que aparezca la palabra “READY” en el estado del MALDI TOF e “IN” en el estado de la placa.
6. En el mapa que se muestra en el Flexcontrol, seleccionar el pozo en el cual se adiciono el BTS.



7. Dar click en el botón “calibrate”. El equipo realiza la calibración y arroja un mensaje de “aceptación” o “rechazo” según sea el caso.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



Nota: Los parámetros de calibración se encuentran definidos por defecto y no se deben cambiar.

Preparación de muestras y controles

Los procedimientos descritos a continuación deben llevarse a cabo en cabina de flujo laminar tipo II, con el fin de garantizar la bioseguridad y esterilidad del proceso.

Preparación de la muestra con la matriz HCCA a partir de cultivos bacterianos sólidos

1. Con un asa estéril tome una colonia pura directamente desde el agar y transfiera a un pozo desocupado de la placa de MALDI. Repita este proceso con las muestras que vaya a analizar.
Nota: es muy importante que la colonia que se tome esté claramente pura dado que, si se toma una mezcla de diferentes microorganismos, no se podrá obtener la identificación por MALDI TOF.
2.Pipetee 1,0 µl de BTS como control en un pozo desocupado de la placa y deje secar a temperatura ambiente
Nota: Una vez usado el BTS, cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
3.Cubra cada uno de los pozos de muestras y control BTS con 1,0 µl de HCCA. El HCCA debe ser aplicada máximo 30 minutos después de que se colocó la muestra o el BTS en la placa. Si se supera este tiempo, la muestra o el BTS no debe ser analizado.
Nota: Una vez usado el BTS cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
4.Deje secar la matriz HCCA en los pozos a temperatura ambiente. En este punto se debe observar una mezcla homogénea entre la matriz HCCA y la muestra o el BTS
5.Lleve la placa al equipo de MALDI para su análisis.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Preparación de la muestra con la matriz HCCA a partir de cultivos bacterianos líquidos

1. Transfiera 1,0 µl del medio líquido a un pozo desocupado de la placa. Repita este proceso para todas las muestras que se vayan a analizar.
Nota: Es muy importante que el cultivo esté puro dado que, si se toma una mezcla de diferentes microorganismos, no se podrá obtener la identificación por MALDI TOF.
2. Pipetee 1,0 µl de control BTS en un pozo desocupado de la placa y deje secar a temperatura ambiente
Nota: Una vez usado el BTS cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
3.Cubra cada uno de los pozos de muestras y control BTS con 1,0 µl de matriz HCCA. El HCCA debe ser aplicada máximo 30 minutos después de que se colocó la muestra o el BTS en la placa. Si se supera este tiempo, la muestra o el BTS no debe ser analizado.
Nota: Una vez usado el BTS cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
4.Deje secar la matriz HCCA en los pozos a temperatura ambiente. En este punto se debe observar una mezcla homogénea entre la matriz HCCA y la muestra o el BTS
5.Lleve la placa al equipo MALDI para su análisis.

Preparación de la muestra con la matriz HCCA a partir de cultivos bacterianos sólidos (Protocolo extendido)

Nota: Este protocolo es recomendado para microorganismos difíciles como Micobacterias

1.Con un asa estéril tome una colonia pura directamente desde el agar y transfiera a un pozo desocupado de la placa de MALDI. Repita este proceso para todas las muestras que se vayan a analizar
Nota: Es muy importante que la colonia que se tome esté claramente pura dado que, si se toma una mezcla de diferentes microorganismos, no se podrá obtener la identificación por MALDI TOF.
2.Pipetee 1,0 µl de ácido fórmico (70%) y deje secar a temperatura ambiente.
3.Pipetee 1,0 µl de control BTS en un pozo desocupado de la placa y deje secar a temperatura ambiente.
Nota: Una vez usado el BTS cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
4.Cubra cada uno de los pozos de muestras y control BTS con 1,0 µl de matriz HCCA. La matriz HCCA debe ser aplicada máximo 30 minutos después de que se colocó la muestra o el BTS en la placa. Si se supera este tiempo, la muestra o el BTS no debe ser analizada.
Nota: Una vez usado el BTS cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
5.Deje secar la matriz HCCA en los pozos a temperatura ambiente. En este punto se debe observar una mezcla homogénea entre la matriz HCCA y la muestra o el BTS.
6.Lleve la placa al equipo MALDI para su análisis.

Preparación de la muestra con la matriz HCCA a partir de cultivos de hongos filamentosos (método rápido).

1. Pipetee 1,0 µl de ácido fórmico (70%) en un pozo desocupado de la placa de MALDI.
2.Posteriormente, sumerja un asa recta en la gota de ácido fórmico y luego tome una muestra de micelio, luego deposítela en la gota de ácido fórmico.
3. Deje secar a temperatura ambiente.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

4. Cubra cada uno de los pozos de muestras y control con 1,0 µl de matriz HCCA. La matriz HCCA debe ser aplicada máximo 30 minutos después de que se colocó la muestra o el control en la placa. Si se supera este tiempo, la muestra o el control no debe ser analizada.
5.Deje secar la matriz HCCA en los pozos a temperatura ambiente. En este punto se debe observar una mezcla homogénea entre la matriz HCCA y la muestra o el control.
6.Lleve la placa al equipo MALDI para su análisis.

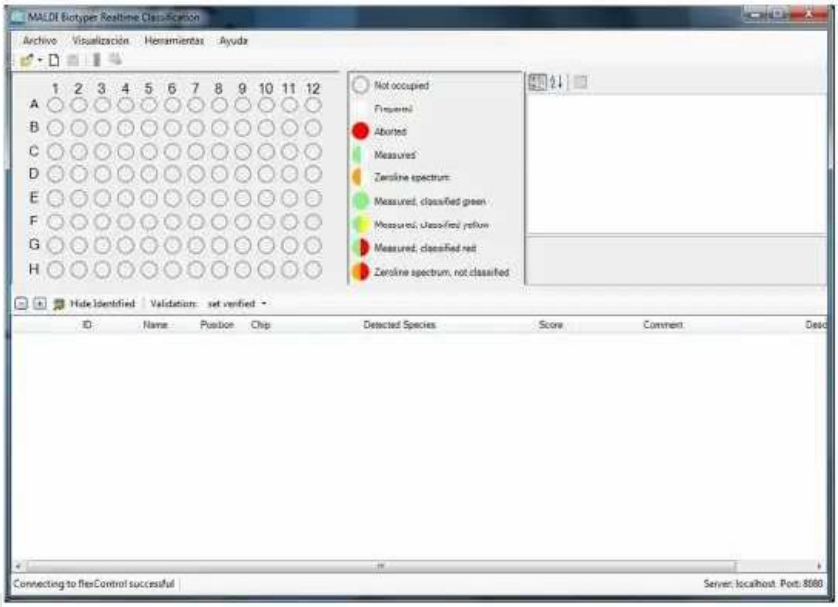
Preparación de la muestra con la matriz HCCA a partir de cultivos de levaduras.

1. Agregue 50 µl de agua estéril en microtubos de 1,5 ml (tanto para muestras como controles).
2. Con el apoyo de un asa de inoculación de 1,0 µl, tome una colonia aislada de levadura y transfiera al microtubo que contiene 50 µl de agua estéril (muestras y controles respectivamente). Luego, asegure la tapa del tubo.
3. Agregue 50 µl de etanol al 100% en cada tubo.
4. Mezclar con el apoyo de micropipeta ajustada a 50 µl y pipetear el líquido de arriba hacia abajo 10 veces para homogenizar.
5.Producto de la suspensión previamente realizada, agregue 1,0 µl a la placa en un pozo libre.
6. Permitir que el inóculo se seque por 2 minutos a temperatura ambiente.
7. Cubra el inóculo seco con 1,0 µl de ácido fórmico al 70%.
8. Seque por 2 minutos a temperatura ambiente.
9. Agregar BTS a un pozo libre de ácido fórmico.
10. Tan pronto se sequen los inóculos agregar 1,0 µl de matriz HCCA.
11. Seque por 2 minutos a temperatura ambiente.
12 Lleve la placa al equipo MALDI para su análisis.

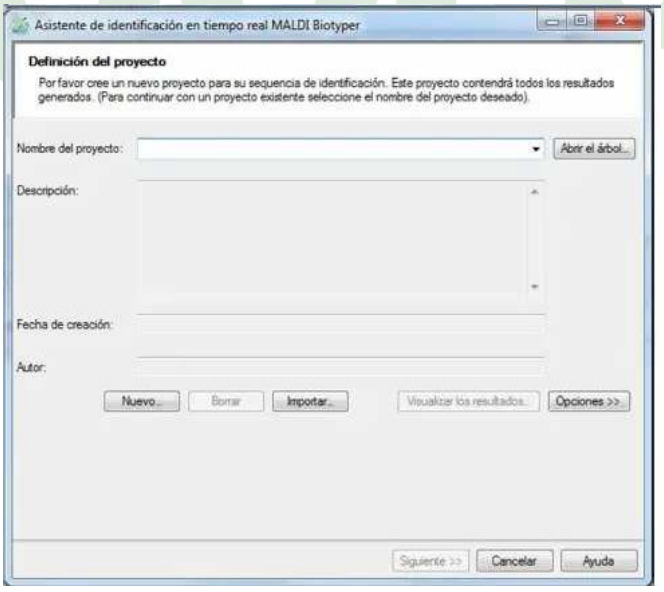
Análisis de muestras

1. Comprobar que el programa FlexControl se esté ejecutando, si no, abrirlo.
2. Pulsar el botón IN/OUT en el MALDI TOF e insertar la placa en el equipo. Comprobar que la placa quedó ingresada correctamente y que no esté inclinada.
3.Pulsar el botón IN/OUT en el MALDI TOF para que la placa quede dentro del equipo. En el MALDI TOF se encenderá una luz naranja indicando que se está ingresando la placa. Esperar a que la luz esté en verde
4.Abrir la aplicación MALDI Biotyper RTC. Aparecerá la siguiente ventana:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

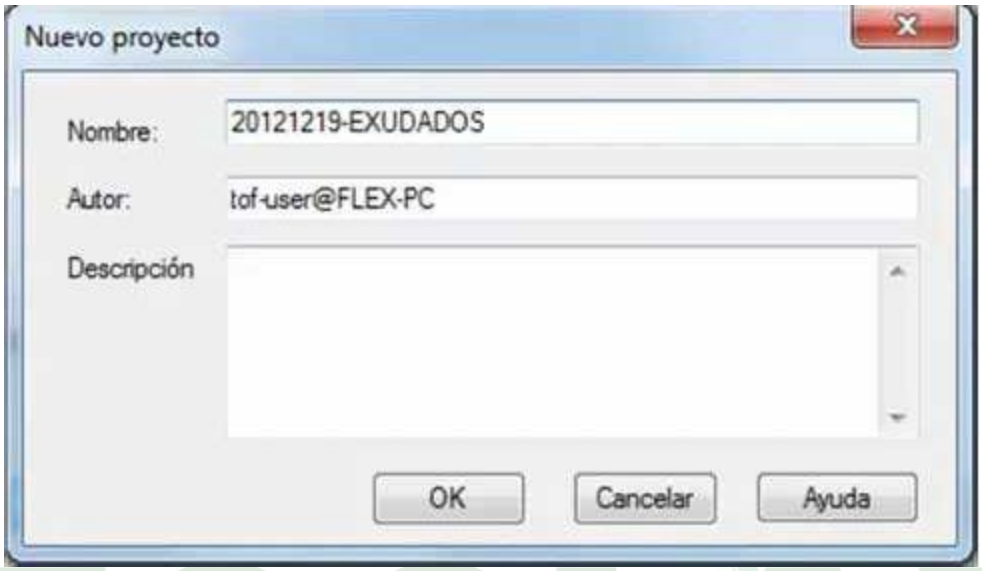


5. Dar click en la opción “ARCHIVO” (menú superior) y luego en “NUEVA IDENTIFICACIÓN”. Se despliega la siguiente ventana:

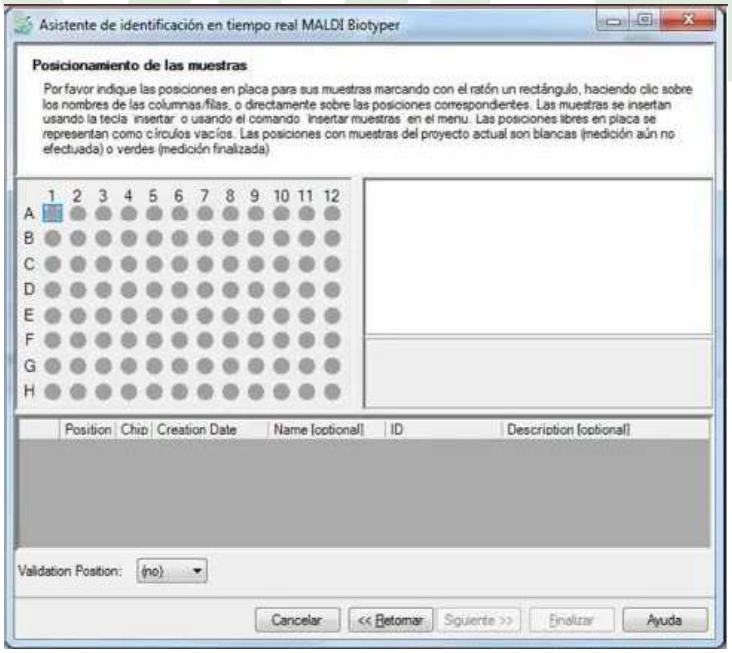


6. Dar click en la opción “NUEVO”. Se despliega la siguiente ventana:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

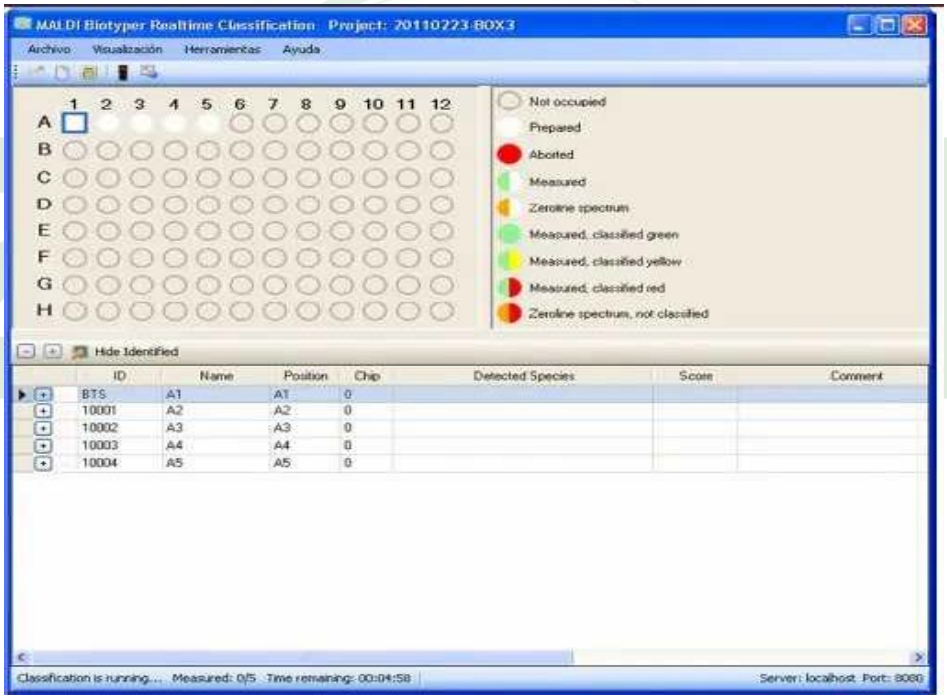


7. Colocar el nombre del proyecto. Se recomienda colocar un nombre con la siguiente estructura: DíaMesAño_consecutivo del día (DDMMAAAA_consecutivo). Pulsar el botón OK y posteriormente el botón "SIGUIENTE". Se abre la siguiente ventana:

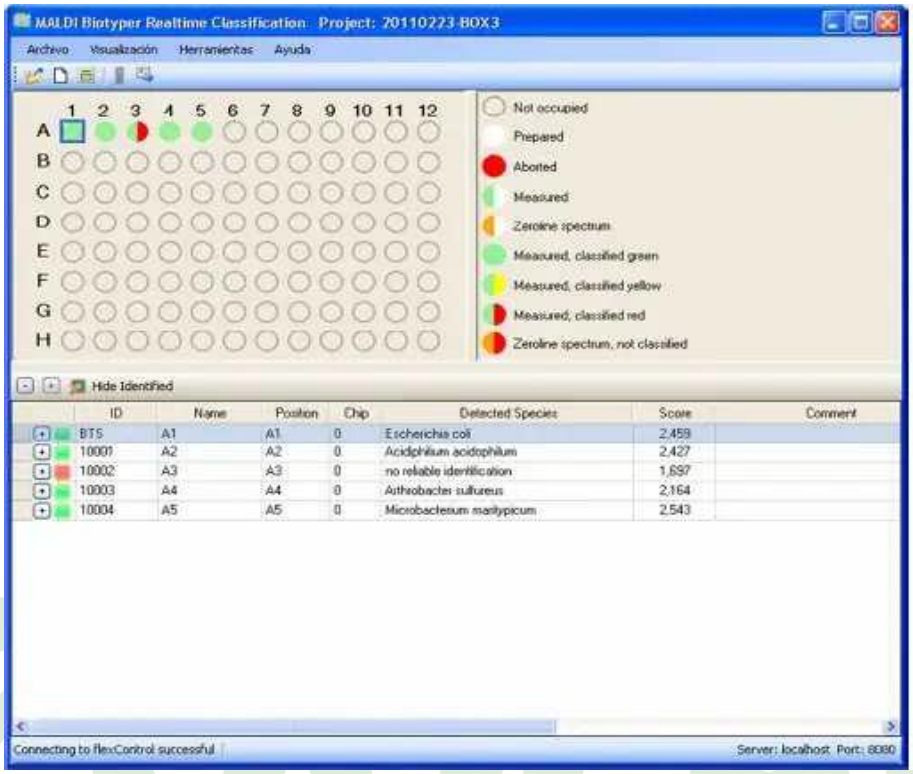


La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

8. En el mapa de la placa, seleccionar el primer pozo de la primera fila en el cual se encuentran las muestras, dar click derecho sobre el pozo y seleccionar la opción “Sequential InserMode”. Posteriormente, colocar el número de pozos con muestras en la fila seleccionada.
9.Repetir el proceso para las siguientes filas hasta tener seleccionados todos los pozos con muestra
10.Dar click en finalizar
Nota: Antes de dar click en finalizar, verificar que la placa ya esté lista para su análisis en el interior del MALDI TOF y que el equipo esté en con la luz verde en el indicador TARGET: ACCESS
11.En el MALDI TOF, se encenderá en verde el indicador SYSTEM: AUTOMODE y el análisis comenzará de forma automática
12.Aparece la siguiente ventana donde podemos ir viendo tanto el análisis de las muestras como su identificación a tiempo real.



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



13.Para ver o imprimir el informe de resultados dar click en la opción “View” y luego en la opción “Results”.
14.Para retirar la placa, oprimir el botón IN/OUT en el MALDI TOF. Se encenderá la luz naranja en el indicador TARGET: IN PROGRESS. Esperar hasta que se encienda la luz verde en el indicador TARGET: ACCESS
15.Abrir la tapa del MALDI TOF y sacar la tarjeta. Posteriormente, oprimir el botón IN/OUT en el MALDI TOF para desplazar el reservorio de la placa al interior del equipo. Se iniciará automáticamente el vació para dejar listo el equipo para el siguiente análisis.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

10. CULTIVO BACTERIAS AEROBIAS, AEROBIAS FACULTATIVAS Y MICROAEROFILICAS

TÉCNICA: CULTIVO BACTERIAS AEROBIAS, AEROBIAS FACULTATIVAS Y MICROAEROFÍLICAS

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Fluidos, secreciones, excreciones y tejidos de cualquier especie animal	Aislamiento de bacterias aerobias, aerobias facultativas o microaeofílicas en muestras biológicas de fluidos, secreciones, excreciones y tejidos.	Aislamiento e identificación	Bacterias aerobias, aerobias facultativas o microaeofílicas	24 - 72 horas

- Atemperar a 18-25°C una caja de Agar sangre, una de Agar Chocolate y una de Agar Mc Conkey para la siembra de muestras que no requieren enriquecimiento.
- Si las muestras requieren enriquecimiento: Atemperar a 18-25°C medio líquido de enriquecimiento BHI
- Marcar los medios de cultivo con el número de caso asignado y la identificación de la muestra.
- Si la muestra viene en medio de transporte tomar el hisopo y realizar 1 o 2 estrías sobre cada caja de agar: importante realizar estos procedimientos frente al mechero o en la cabina de seguridad biológica, empezar por el Agar Chocolate, seguir con el Agar Sangre y por último el agar Mc Conkey.

- Con ayuda de un asa curva realizar la siembra por agotamiento.

- **Muestras de Orina y Leche:** se debe obtener la muestra desde el recipiente con el asa curva, trazar una estría en agar sangre. Repetir el procedimiento en el Agar Mac Conkey. A partir del inóculo sembrar por agotamiento.

- **Muestras de Tejidos y Líquidos Estériles**: se debe primero sembrar en un medio de enriquecimiento (BHI) durante 3 días antes de realizar la siembra en agar sangre, agar chocolate y agar Mac Conkey.

- **Muestras de Materia Fecal**: Sembrar en Tetrationato, incubar 37°C durante 24 horas, posteriormente sembrar en Agar Salmonella-Shiguella y en Agar McConkey.

- Si hay crecimiento en alguno de los medios inoculados, realizar coloración de Gram, identificación bioquímica y antibiograma.

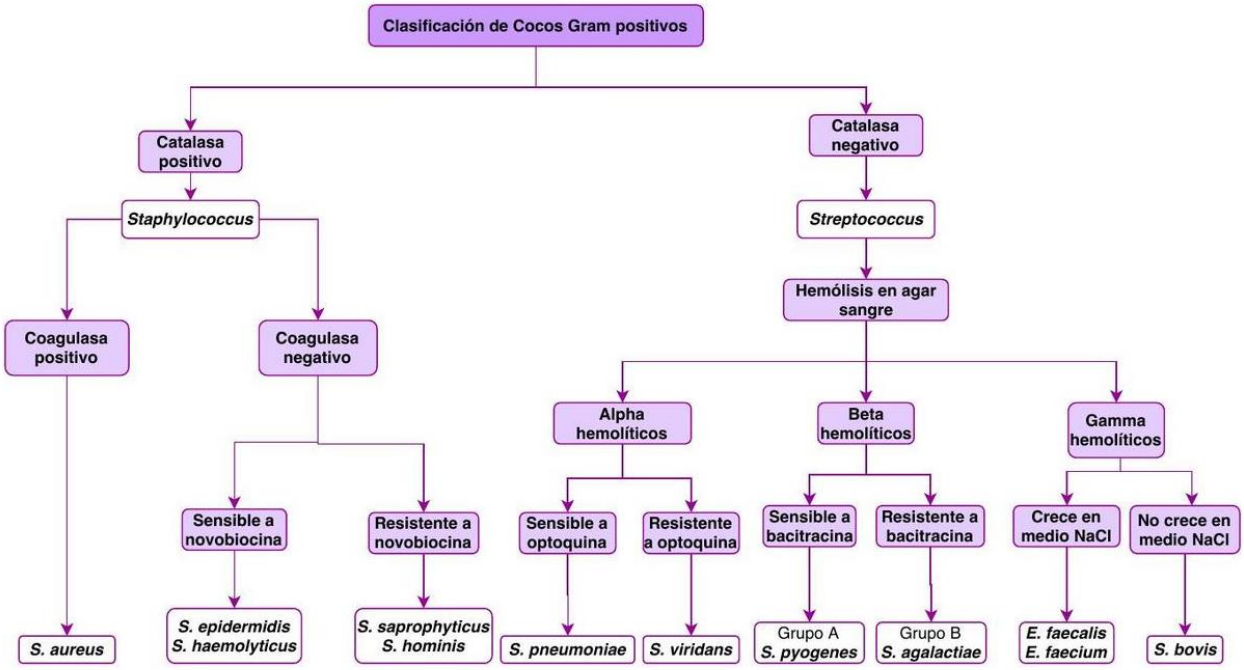
- Consignar lo observado en el LBFMT 031 Registro de microbiología.

- **Interpretación**: Un **cultivo negativo** es aquel en el cual no se evidencia crecimiento bacteriano después de finalizar el tiempo de incubación en los medios sólidos. Un **cultivo positivo** es aquel en el que se evidencia crecimiento bacteriano durante el tiempo de incubación. El crecimiento debe evidenciarse sobre las estrías de siembra, si se observan colonias distantes de las estrías de siembra, deben ser consideradas como contaminación, en este caso el cultivo también se interpretaría como negativo.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

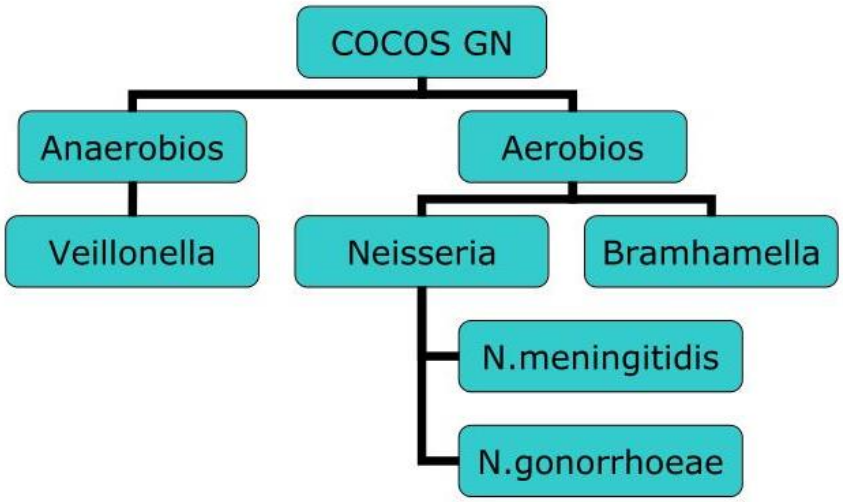
11. FLUJOGRAMAS PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

11.1 IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAMPOSITIVOS

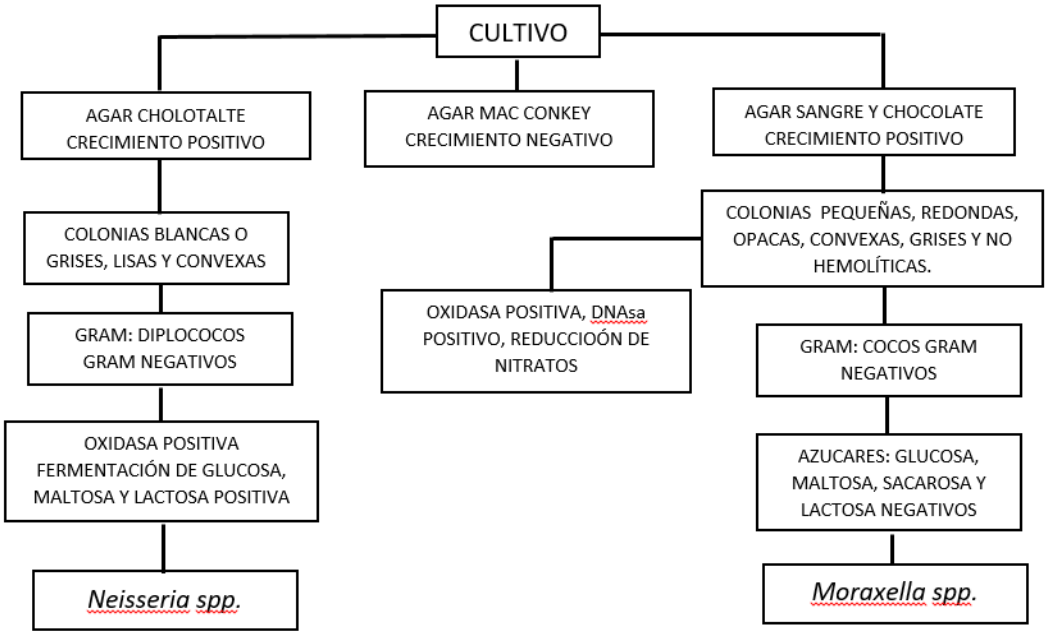


La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

11.2 IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAMNEGATIVOS

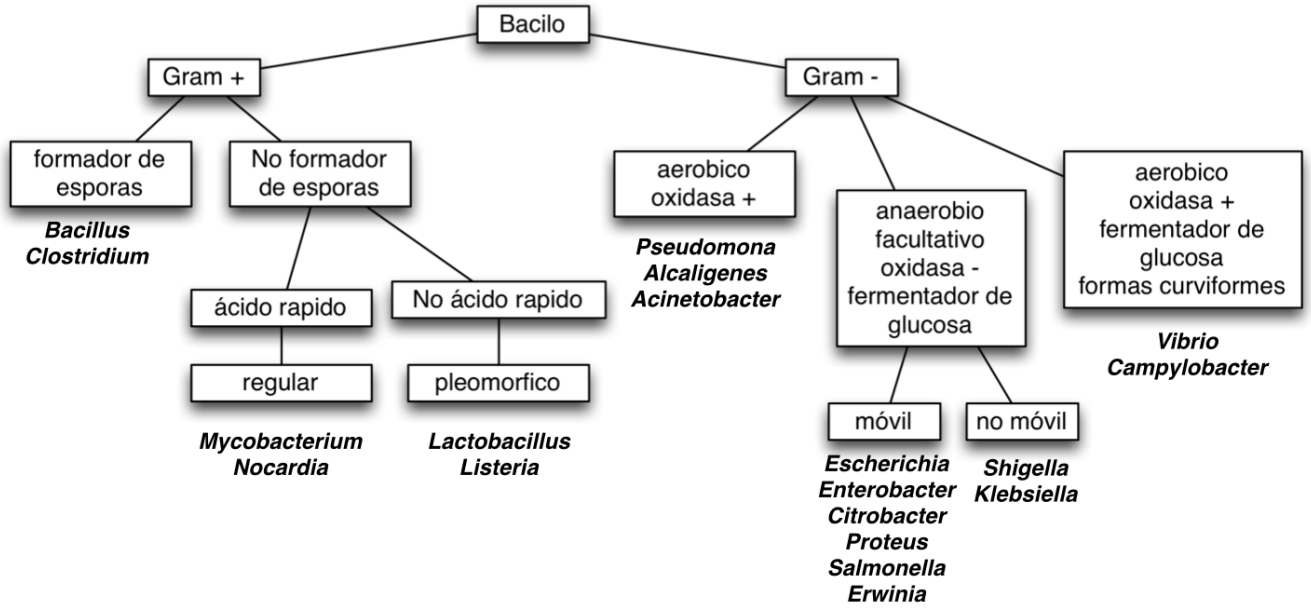


La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



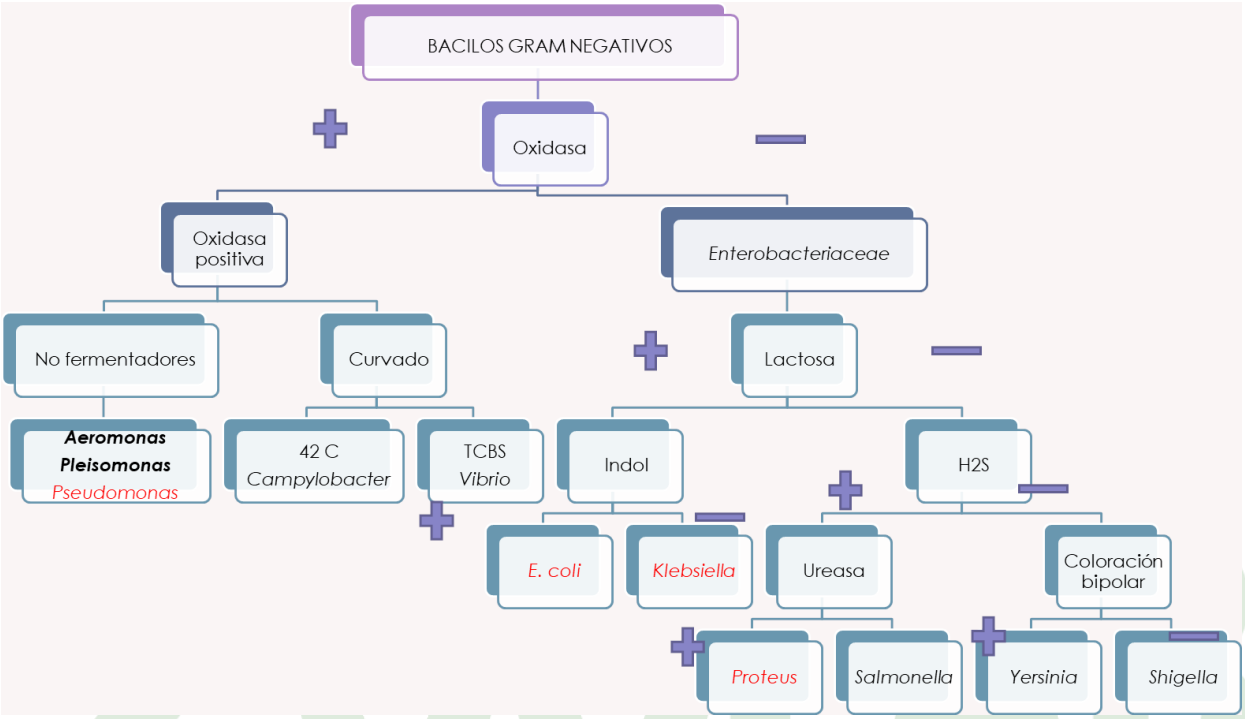
11.3 IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAMPOSITIVOS Y GRAM NEGATIVOS

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



11.4 IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAMNEGATIVOS

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

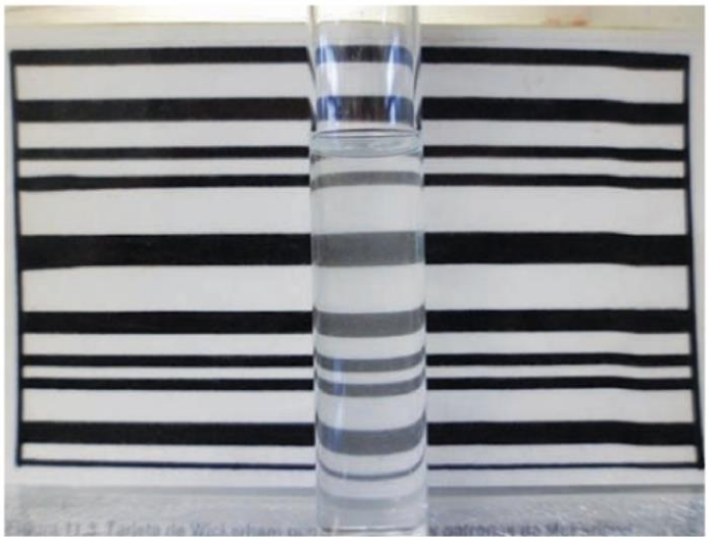


La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

12. ANTIBIOGRAMA

Para el antibiograma se debe realizar una siembra masiva de la bacteria por evaluar en agar sangre o en agar Muller-Hinton, el cual permite el crecimiento de la mayoría de microorganismos. Se colocan sobre el agar Muller-Hinton ya sembrado pequeños discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos (Sensidiscos). Al colocar los sensidiscos sobre el agar, estos absorben agua del medio, lo que permite la disolución del antibiótico y su difusión. De esta manera se genera un gradiente de concentración del antibiótico en el agar que rodea cada sensidisco.
Después de la incubación se observará cuándo hay inhibición: la formación alrededor del sensidisco de una zona de no-crecimiento, correspondiente a la zona donde las concentraciones de antibiótico son inhibitorias, seguida de una zona de crecimiento masivo. Mientras más sensible sea la bacteria al antibiótico, más grande será el halo de inhibición.
Para realizar la prueba del antibiograma es necesario partir de una concentración inicial conocida del microorganismo y, en lo posible, estandarizar esta concentración para probar la resistencia o susceptibilidad a los diferentes antibióticos. Para lograr esto, se utiliza el patrón de MacFarland el cual es un sistema indirecto que permite estandarizar el número de bacterias que hay por mililitro de medio. Utilizando los patrones ya establecidos se compara la solución bacteriana con dichos patrones sobre la tarjeta de Wickerham. Utilizando los patrones de MacFarland se compara el tubo con la bacteria para obtener un número estándar de células por mililitro. Se ajusta la turbidez del medio diluyéndolo con solución salina hasta obtener una densidad óptica igual a la del estándar de MacFarland.

Vanegas López, M. C. (2015). Guías para el laboratorio de bacteriología. Bogotá, Colombia: Universidad de los Andes. Recuperado de https://ezproxy.uniagraria.edu.co:2081/es/ereader/bibliouniagraria/70556?page=102.



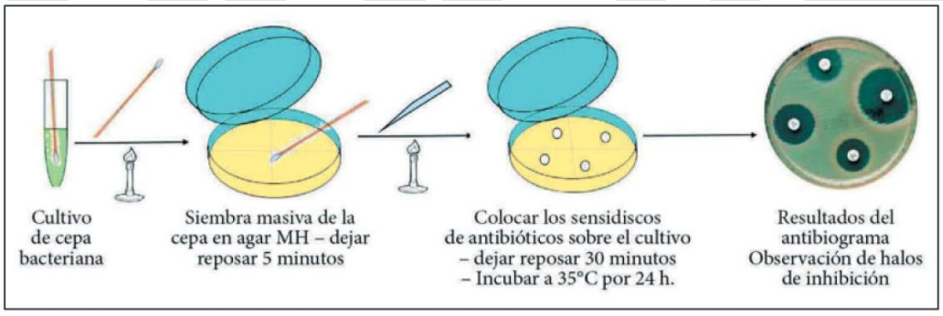
Escala de MacFarland sobre una tarjeta de Wickerham.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

La efectividad de los antibióticos depende de su toxicidad selectiva. Esto hace referencia a la capacidad del antimicrobiano para afectar a un microbio patógeno infligiendo el menor daño posible al huésped. Según el tipo de microorganismo al que afecten, se clasifican como: anti protozoarios, antivirales, antimicóticos y antibacterianos. Un aspecto importante de los antimicrobianos es el mecanismo de acción por medio del cual realizan su tarea. Según Wright, los antibióticos ejercen su actividad antimicrobiana causando daño en alguno de los siguientes procesos vitales de las bacterias:

- Síntesis de pared celular: es el caso de antibióticos Betalactámicos como las penicilinas, las cefalosporinas y las vancomicinas.
- Replicación, transcripción y síntesis proteica a nivel del ribosoma: como ejemplo se encuentran Macrólidos como eritromicina y clindamicina; y Aminoglucósidos como gentamicina y estreptomicina.
- Permeabilidad de la membrana plasmática: antibióticos polimixinas.
- Síntesis de ácidos nucleicos: antibióticos quinolónicos como ciprofloxacina y norfloxacina.

Las pruebas de sensibilidad bacteriana son técnicas que se utilizan para determinar la eficacia antimicrobiana que presenta un determinado compuesto frente a un patógeno específico, es decir, la sensibilidad que el microbio muestra ante el agente antimicrobiano.



Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. También es importante para realizar estudios sobre la evolución de las resistencias bacterianas que permite revisar los protocolos de la antibioticoterapia empírica.

La determinación de la **Concentración Mínima Inhibidora (CMI)** es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

La **Concentración Mínima Bactericida (CMB)** es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

TÉCNICA: ANTIBIOGRAMA - KIRBY BAUER

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Aislamientos de cultivo de bacterias aerobias o aerobias facultativas	Determinación de sensibilidad microbiana a antibióticos en microorganismos aislados en cultivos de gérmenes comunes. Extendido y coloración	KIRBY **BAUER**	Hasta 7 antibióticos	24 horas

12.1 Desarrollo de la prueba

- El antibiograma se debe hacer a partir de un cultivo puro en medio Mueller Hinton, excepto para los géneros Haemophilus y Streptococcus, para los cuales se debe usar Agar Chocolate y Agar Sangre respectivamente.
- Atemperar un medio de Mueller Hinton (o Agar Sangre o Chocolate si es requerido) y marcarlo con el número de caso correspondiente.

- **Preparación del inóculo:** A partir de la placa de cultivo tomar cuatro a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, con un asa de siembra y preparar una suspensión directa en solución salina estéril. Ajustar la suspensión a la escala 0,5 de Mc. Farland.

- **Inoculación de las Placas**: Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Inocular la superficie seca de la placa de Mueller Hinton (o Agar Sangre o Chocolate si es requerido), distribuyendo con el hisopo en tres direcciones por siembra masiva para asegurar una distribución uniforme del inóculo.

- Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

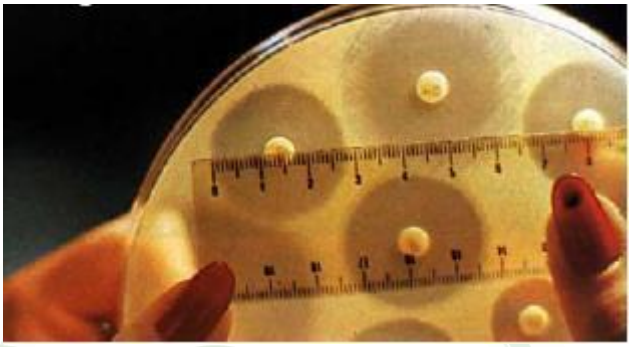
- **Aplicación de los sensidiscos**: Colocar los sensidiscos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Distribuir los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 7 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

- **Incubación**: Incubar lar placas en posición invertida a 36-38°C durante 18 a 24 horas.

- **Lectura de las placas e interpretación de los resultados:** Medir los diámetros de las zonas de

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador. Observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo.



- En los medios suplementados con sangre, las zonas son medidas en la parte superior de la superficie del agar y retirando la tapa. Tener cuidado de no medir la zona de hemólisis sino la de inhibición del crecimiento.

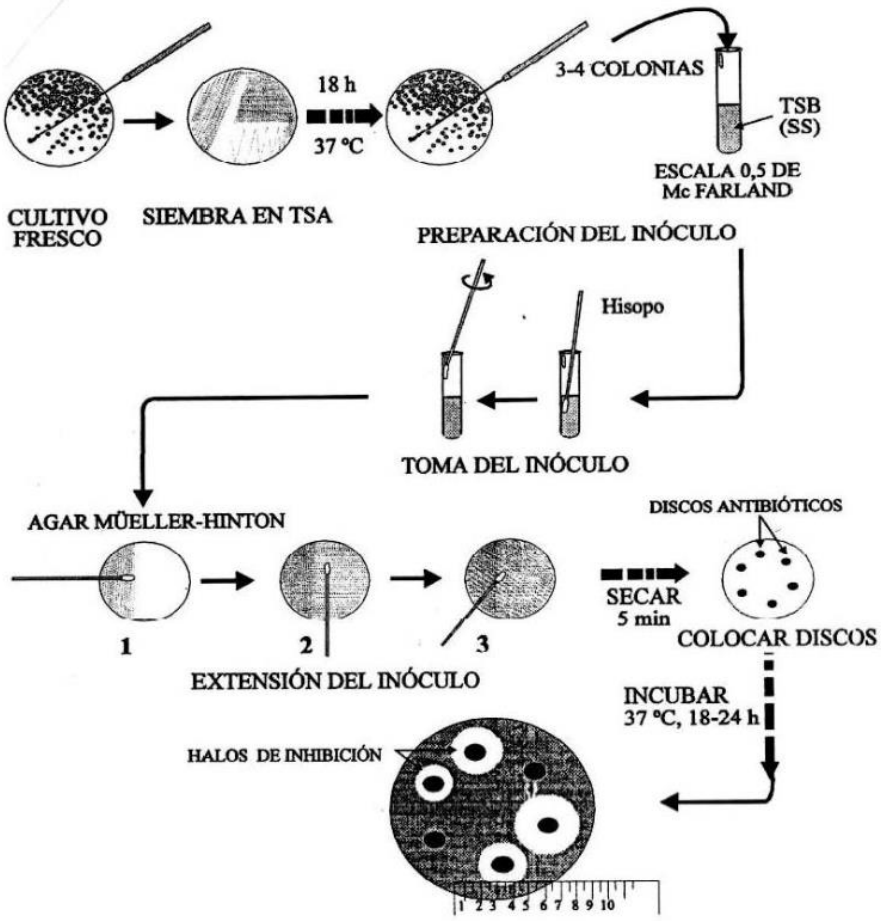


El punto final debe tomarse como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Sin embargo, las colonias mayores que crecerán dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. Algunos *Proteus spp*, debido a su gran movilidad, pueden presentar un velo de invasión o “swarming”

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

dentro de las zonas de inhibición de algunos antibióticos. En estos casos el velo del swarming debe ser ignorado al momento de medir los halos de inhibición. Se pueden obtener resultados de sensibilidad, sensibilidad intermedia o resistencia.

- Registrar los resultados obtenidos en el LBFMT031 Registro de Microbiología.



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

12.2 Lectura e Interpretación de la zona de inhibición

Lecturas E Interpretación De Las Zonas De Inhibición. ENTE ANTIMICROBIANO	**GENERACION**	**SIGLA**	**POTENCIA**	**RESISTENTE**	**SENSIBLE**
AMIKACINA		AK	30 mcg	≤14 mm	≥17 mm
AMPICILINA		A	10 mcg	≤13 mm (28)*(18)H(16)E(23)Sb	≥17 mm (29)*(22)H(17)E(24)Sb
AMP-SULBACTAM		SAM	10/10 mcg	≤11 mm (19)H	≥15 mm (20)H
AMOXICILINA		AX	25 mcg	≤13 mm	≥17 mm
AMOX- AC. CLAVULANICO		AMC	20/10 mcg	≤13 mm (19) * (19)H	≥18 mm (20) *(20) H
AMOX-SULBACTAM		SO	10/10 mcg	≤13 mm (19) * (19)H	≥18 mm (20) *(20) H
ACIDO NALIDIXICO		W	30 mcg	≤13 mm (25) Nm	≥19 mm (26) Nm
ACIDO OXOLINICO		O	2 mcg	≤10 mm	≥11 mm
ACIDO PIPEMIDICO		PI	20 mcg	≤13 mm	≥19 mm
AZITROMICINA		AZT	15 mcg	≤13 mm (11)H(19) Nm	≥18 mm (12)H(20) Nm
AZTREONAM		AZ	30 mcg	≤15 mm (25)H	≥22 mm (26)H
CEFADROXILO	(1)	CPH	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFACLOR	(2)	FAC	30 mcg	≤14 mm (16)H	≥18 mm (20)H
CEFALEXINA	(1)	CN	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFALOTINA	(1)	CF	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFAZOLINA	(1)	CEZ	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFAMANDOL	(2)	CMA	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFEPIME	(4)	CPM	30 mcg	≤14 mm (30)N(25)H(21) Sv (23) Sb	≥18 mm (31)N(26)H(24) Sv,Sb
CEFIXIMA	(3)	CFM	5 mcg	≤15 mm (20)H(30)N	≥19 mm (21)H(31)N
CEFOPER-SULBACTAM	(3)	SFP	30/75 mcg	≤15 mm	≥21 mm
CEFOTAXIMA	(3)	CTX	30 mcg	≤14 mm (25)H(30)N(23) Sb (25) Sv(33)Nm	≥23 mm (26)H(31)N(24)Sb(28)Sv(34)Nm
CEFOXITINA	(2)	CXA	30 mcg	≤14 mm(21)A,L (23)N(24)**	≥18 mm(22)A,L(28)N(25)**
CEFPROZIL	(2)	CPR	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFRADINA	(1)	CD	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFTAZIDIMA	(3)	CAZ	30 mcg	≤14 mm (25)H(30)N(17)B	≥18 mm (26)H(31)N(21)B

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Lecturas E Interpretación De Las Zonas De Inhibición. ENTE ANTIMICROBIANO	**GENERACION**	**SIGLA**	**POTENCIA**	**RESISTENTE**	**SENSIBLE**
CEFTRIAXONA	(3)	CTR	30 mcg	≤13 mm (25)H (24)Sv(23)Sb(34)N(33)Nm	≥21 mm (26)H(27)Sv(24)Sb(35)N(34)Nm
CEFUROXIMA i v	(2)	CXM	30 mcg	≤14 mm (16)H(25)N	≥18 mm (20)H(31)N
CIPROFLOXACINO		CIP	5 mcg	≤15 mm (20)H(27)N(32)Nm	≥21 mm (21)H(41)N(21)E(35)Nm
CLARITROMICINA		CLR	15 mcg	≤13 mm (10)H (16),S,Sv	≥18 mm (13)H (21),S,Sv
CLINDAMICINA		Da	2 mcg	≤14 mm (15)S,Sv	≥21 mm (19)S,,Sv
CLORANFENICOL		C	30 mcg	≤12 mm (25)H(20)$(17)S,Sv,Sb(19)Nm	≥18 mm (29)H(21)$,S,Sv,Sb(26)Nm
CLOXACILINA		CX	1 mcg	≤10 mm	≥13 mm
COLISTIN		CL	10 mcg	≤10 mm	≥11 mm
DICLOXACILINA		DX	1 mcg	≤10 mm	≥13 mm
DOXICICLINA		DXS	30 mcg	≤10 mm (9)Ac(12)*,E	≥14 mm (13)Ac(16)*,E
ENOXACINO		E	10 mcg	≤14 mm (31)N	≥18 mm (36)N
ERITROMICINA		EM	15 mcg	≤13 mm (15)S,,Sv	≥23 mm (21)S,Sv
ERTAPENEM		ETP	10 mcg	≤15 mm (18)H	≥19 mm (19)H
ESTREPTOMICINA		S	10 mcg	≤11 mm	≥15 mm
ESTREPTOMICINA 300		SE	300 mcg	≤6 mmE	≥10 mmE
FOSFOMICINA		FO	200 mcg	≤12 mm	≥16 mm
FURAZOLIDONA		FZ	100 mcg	≤14 mm	≥17 mm
GENTAMICINA		GE	10 mcg	≤12 mm	≥15 mm
GENTAMICINA 120		G	120 mcg	≤ 6 mmE	≥10 mmE
IMIPENEM		IPM	10 mcg	≤13 mm (15)H	≥16 mm(16)H
KANAMICINA		K	30 mcg	≤13 mm	≥18 mm
LEVOFLOXACINO		LVX	5 mcg	≤13 mm (16)H(15)*	≥17 mm(19)*
LINCOMICINA		L	2 mcg	≤16 mm	≥21 mm
LINEZOLID		LZD	30 mcg	≤20 mmE	≥21 mm (23)E
MEROPENEM		MRP	10 mcg	≤13 mm (19)H(15)B(29)Nm	≥16 mm(20)H(20)B(30)Nm
MINOCICLINA		M	30 mcg	≤12 mm(25)Nm(14)B,Sm,*,E	≥16 mm(26)Nm(19)B,Sm,*,E
MOXIFLOXACINO		MXF	5 mcg	≤20 mm (*)(17)H(14)$	≥24 mm (*)(18)H(18)$
NEOMICINA		N	30 mcg	≤12 mm	≥17 mm
NITROFURANTOINA		NIT	300 mcg	≤14 mm	≥17 mm
NORFLOXACINO		NOR	10 mcg	≤12 mm	≥17 mm

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Lecturas E Interpretación De Las Zonas De Inhibición. ENTE ANTIMICROBIANO	**GENERACION**	**SIGLA**	**POTENCIA**	**RESISTENTE**	**SENSIBLE**
OFLOXACINO		FLX	5 mcg	≤12 mm (24)N(14)*(15)H	≥16 mm (31)N(18)*(16)H
OXACILINA		OX	1 mcg	≤19 mm$ (10)A(17)**	≥20 mm $(13)A(18)**
PENICILINA		P	10 UOF	≤19 mm$ (28)*(26)N(14)E(23)Sb	≥20 mm$ (29)*(47)N(15)E(24)Sb
PIPERACILINA		PE	100 mcg	≤17 mm	≥21 mm (18)P
PIPERAC/TAZOBACTAM		TZ	100/10 mcg	≤17 mm (20)H	≥21 mm H (18)P(18)*
POLIMIXINA B		PB	300 U	≤11 mm	≥12 mm
RIFAMPICINA		R	5 mcg	≤16 mm(19)Nm	≥20 mm (19)$(25)Nm
ROXITROMICINA		RXT	15 mcg	≤13 mm	≥23 mm
SULFATRIMETOPRIM		SX	25 mcg	≤10 mm (15)$(25)Nm	≥16 mm (19)$(30)Nm
SULFONAMIDA		SF	250 mcg	≤12 mm	≥17 mm
TEICOPLANINA		TEI	30 mcg	≤10 mm	≥14 mm
TETRACICLINA		Te	30 mcg	≤11 mm (18)S,,Sv(30)N(25)H(14)*,E,V	≥15 mm (23)S,,Sv(38)N(29)H(19)*,E,V
TOBRAMICINA		TB	10 mcg	≤12 mm	≥15 mm
TRIMETOPRIM		TMP	5 mcg	≤10 mm	≥16 mm
VANCOMICINA		VA	30 mcg	≤16 mm(14)E	≥17 mmS,E

12.3 Selección De Antibióticos

- Los antimicrobianos de la misma clase pueden tener actividades in-vitro similares frente a los patógenos bacterianos seleccionados. Por lo anterior se debe seleccionar un antimicrobiano representativo que permita pronosticar la sensibilidad de otros miembros de la misma clase

- Ciertos microorganismos pueden ser intrínsecamente resistentes a clases de antimicrobianos concretas; por tanto, es innecesario usar sensidiscos de antibióticos para los cuales el microorganismo aislado es resistente. Debe determinarse el tipo de resistencia intrínseca para dichos microorganismos bien sea a partir de la literatura científica o a través de prueba.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

12.4 Sensidiscos Más Usados En Veterinaria Y Su Espectro

ANTIMICROBIANO	GRAM POSITIVO	GRAM NEGATIVO
ACIDO NALIDIXICO	No	SI
AMPICILINA	SI	SI
BACITRACINA	SI	No
CEFALOTINA	SI	SI
CLORANFENICOL	SI	SI
CLOXACILINA	SI	No
COLISTIN	No	SI
ENROFLOXACINA	SI	SI
ERITROMICINA	SI	No
ESTREPTOMICINA	SI	SI
FOFOMICINA	SI	SI
GENTAMICINA	No	SI
KANAMICINA	SI	SI
LINCOMICINA	SI	SI
NEOMICINA	SI	SI
NITROFURANTOINA	SI	SI
OXACILINA	SI	No
PENICILINA	SI	No
PENICILINA G	SI	No
POLIMIXINA B	No	SI
RIFAMPICINA	SI	No
SULFASOXASOLE	SI	SI
TETRACICLINA	SI	SI
TRIMETOPRIM	SI	SI
TYLOSIN	SI	SI
VANCOMICINA	SI	No

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

13. CULTIVO DE HONGOS

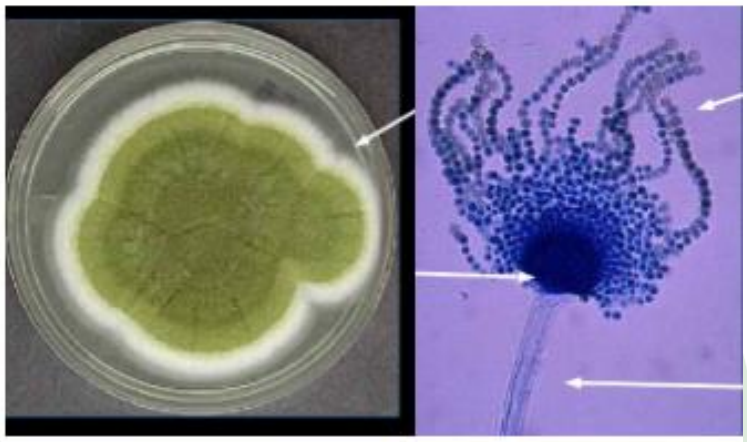
TÉCNICA: CULTIVO DE HONGOS

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Raspados de piel, fluidos, secreciones y excreciones de cualquier especie animal.	Determinación directa de hongos en muestras biológicas de raspados de piel, fluidos, secreciones, excreciones.	Cultivo e identificación	Hongos que crezcan en Agar Sabouraud	22 días

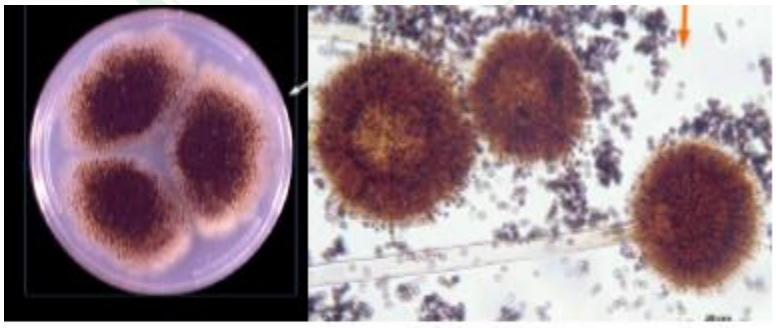
- Atemperar a 18-25°C una caja de Agar Sabouraud.
- Marcar la caja de agar con el número de caso asignado y la identificación de la muestra.
- Independientemente del tipo de muestra (pelo, escamas de piel entre otras) se debe tomar una parte de la misma frente al mechero o en la Cabina de Seguridad Biológica con ayuda de un asa micológica y clavar en el agar asegurándose que no se desprenda del mismo.
- Tapar la caja y sellarla con cinta de enmascarara posteriormente incubar a 18-25°C durante 21 días.
- De presentarse crecimiento se tomará una parte de la colonia teniendo en cuenta de tomar de la parte externa del hongo, se colocará sobre una lámina con una gota de azul de lactofenol, en el caso de presentar crecimiento de hongos filamentosos se realiza método de scotch tape, el cual consiste en colocar suavemente cinta adhesiva sobre la superficie del hongo y luego ésta se deposita en una lámina portaobjetos, donde previamente se ha vertido una gota de azul de lactofenol.
- Identificar bajo el microscopio el género de hongos que presenta crecimiento, discriminando género y de ser posible género y especie.
- **Interpretación**: Un cultivo **negativo** es aquel en el cual no se evidencia crecimiento de colonias de hongos después de 21 días de incubación. Un cultivo **positivo** es aquel en el que se evidencian colonias hongos en los lugares de siembra de las muestras. Si se observa crecimiento de hongos en lugares diferentes a la inoculación de las muestras estos deben ser considerados contaminación.
- A continuación, se observan imágenes de algunos hongos en su presentación macroscópica y microscópica

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

✓ **Aspergillus flavus**



✓ **Aspergillus Níger**

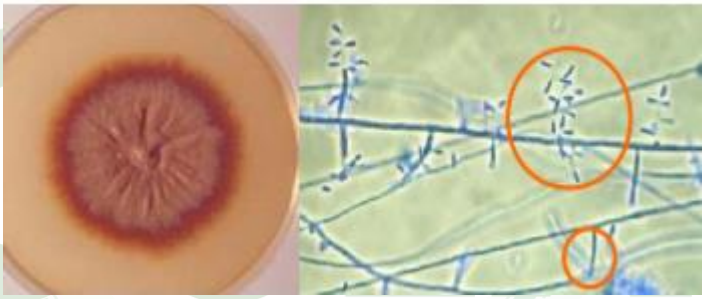


✓ **Aspergillus fumigatus**

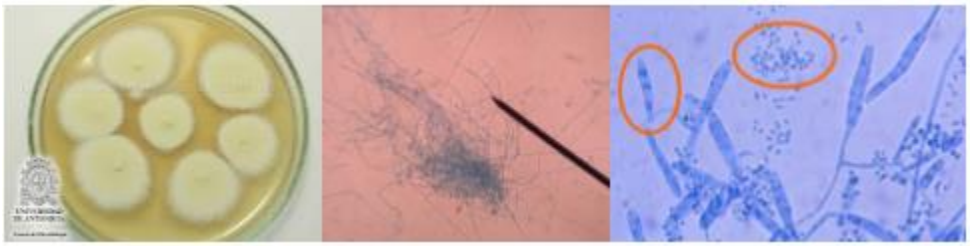
La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



✓ **Trichophyton rubrumm**

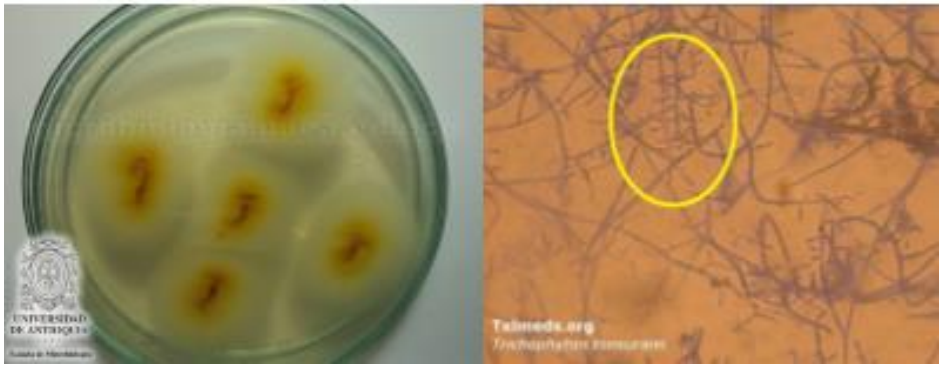


✓ **Trichophyton mentagrophytes**

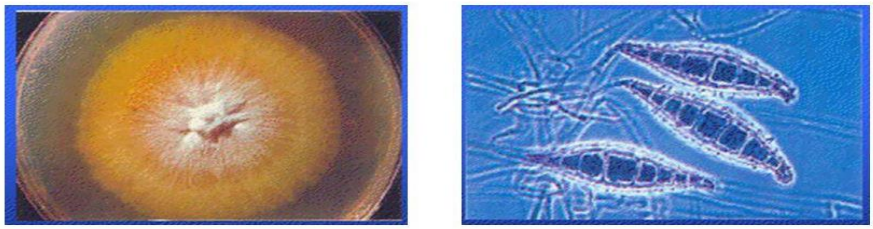


✓ **Trichophyton tonsurans**

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



- ✓ **Microsporum canis**



- ✓ **Epidermophyton floccosum**

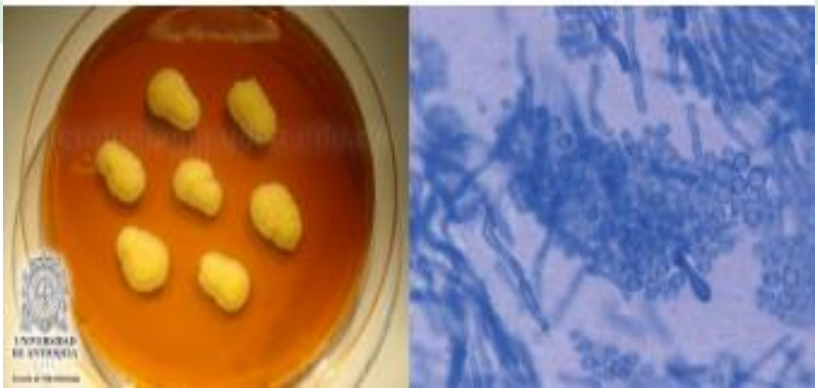


La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

✓ **Cándida albicans**



✓ **Malassezia**



13.1 Aseguramiento de la validez de los resultados

Realizar la verificación del método de acuerdo con el LBPOE009 Aseguramiento de la Validez de los Resultados. Realizar la supervisión de los métodos cada vez que ingrese un nuevo analista y según el DEFMT014 Plan de

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Trabajo Sistema de Gestión y registrarla en el LBFMT095 Supervisión Métodos Analíticos.
Si se evidencian servicios no conformes durante la ejecución del ensayo, se debe registrar en el campo "Observaciones" de las hojas de trabajo y dejar evidencia diligenciando el LBFMT026 Registro y Tratamiento de SNC.

14. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha de Revisión	Versión	Descripción del cambio	Responsable
2013-02-09	001	LBINS031: Aclaración formato de consignación de resultados Num 1,8	CYC
2013-02-09		LBINS032: Aclaración código registro numeral 1,14	CYC
10/09/2010		LBINS033: Complementación instrucción pág. 1	CYC
Marzo 24 de 2012		LBINS039: Se incluye la preparación de soluciones	DS
2013-02-09		LBINS040: Aclaración código formato de consignación de datos	CYC
2013-02-09		LBINS041: Se agrega núm. 1,9	CYC
2014-03-15	002	LBINS031: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
2014-03-15		LBINS032: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
20113-02-09		LBINS033: Aclaración código formato registro datos	CYC
Febrero 9 de 2013		LBINS039: Se cambia razón social de la empresa, se excluye preparación de soluciones	SLC
2014-03-15		LBINS040: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
2014-03-15		LBINS041 : Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

2014-10-11	003	LBINS031: Se realiza revisión del instructivo se incluye en el numeral 1.5. la obligatoriedad de sellar con cinta y en el numeral 1.6. se aclara el caso que se presenten hongos; actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	PAG
2014-10-11		LBINS032: Se realiza revisión del instructivo se incluye Si la muestra es orina, la forma de sembrarlo es en primera instancia tomar el asa (la cual contiene el inoculó), trazar una línea vertical a lo largo de la caja de agar sangre/agar MacConkey. Acto seguido, distribuir el inoculó de forma horizontal (este método de siembra facilita el recuento de unidades formadoras de colonia), en el numeral 1.12 se incluye Las pruebas bioquímicas son realizadas mediante el sistema enteropluritest, el cual permite la identificación exacta del microorganismo aislado. actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	PAG
2014-03-15		LBINS033: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
2014-03-15		LBINS039: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
2014-10-11		LBINS040: Se realiza revisión del instructivo se actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	PAG
2014-10-11	004	LBINS033: Se realiza revisión del instructivo se actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	KAM

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

2014-10-11		LBINS039: Se realiza revisión del instructivo se actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	PAG
Agosto 3 de 2015	005	Se crea el documento integrando los instructivos de Cultivo Campylobacter, Instructivo Para Cultivo y Lectura de Trichomonas sp, LBINS031 Instructivo Cultivo Hongos, LBINS032 Instructivo Cultivo Gérmenes comunes, LBINS033 Ins Hemocultivo, LBINS039 Preparación de medios de cultivo, LBINS040 Instructivo Coloración de Gram, LBINS041 Instructivo Antibiograma, se define continuar el control de cambios a partir de la mayor versión que poseen los documentos que fueron integrados. Se incluye en el documento el histórico del control de cambios.	LFC
Octubre 28 de 2015	006	Se incluye Introducción, Propósito, Alcance Referencias Bibliográficas, Definiciones, Recursos Para La Realización De Los Ensayos	CYC
Enero 5 de 2016	007	Se realizan cambios y actualización a los métodos utilizados	KAM
Enero 2 de 2018	008	Se actualiza numeral 6 Recursos necesarios para realización de análisis. Se actualiza forma de realizar control de calidad de Coloración de Gram. Se incluye apartado de aseguramiento de calidad para todos los procedimientos. Inclusión de antibióticos para antibiogramas en aislamientos a partir de leche.	Yanira Chaparro – Quality Control
Julio 02 de 2020.	009	Se incluyen algunos términos en las definiciones (medio de cultivo, coloración, colonia, espora, cepa, flagelo). Se incluye un nuevo texto en la bibliografía. Se eliminan del listado algunos implementos y medios que ya no se usan como la malla de asbesto, el trípode del mechero de Bunsen, los sobres de microaerofilia, medio líquido de Brucella y medio para tricomonas. Se elimina el método de cultivo por Anaerobiosis. Se Actualiza información y gráficas de	Jeanethe Rojas R. Gerencia de Calidad. Sphefanía Garay Castro Dir. Grandes Especies

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

		algunas pruebas bioquímicas. Se eliminan las tablas de antibióticos para la distribución de la glándula mamaria por considerarse innecesarias. Se elimina el Hemocultivo. Se amplía la información de susceptibilidad a antimicrobianos para la identificación de bacterias. Se incluye la coloración de Gram. Se actualiza el esquema de los cocos gramnegativos, añadiendo la identificación de *Moraxella*. En el 7.1.1. se elimina la información de Leptospira ya que se tiene un POE independiente para esta información.	
Agosto 5 de 2022	010	Se actualizan las referencias bibliográficas y las definiciones del numeral 5. Se actualiza el numeral 6 “Recursos para la realización de los ensayos”. Se incluye Morfología Bacteriana y Tinciones en el numeral 7. Se actualiza todo el numeral referente a Medios de Cultivo (8). Se actualizan gráficos y contenidos del numeral 9 = Pruebas Bioquímicas de Identificación”. Se elimina la información de enteropluritest y se reemplaza por la de API20E, que es la que usamos actualmente. En el numeral 11 “Flujogramas” se eliminan los esquemas de identificación de bacterias exigentes cuya identificación no realizamos. Se actualiza el ítems de antibiograma y se incluye una imagen de medición del halo de inhibición.	Laura Poveda Mendieta Dir. Científica de Básicas. Jeanethe Rojas R. Gerente de Calidad.
Marzo 28 de 2024	012	Se agrega proceso de MALDI-TOF para identificación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos.	Karen Moreno

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

TABLA DE CONTENIDO

1. 2

2. 2

3. 2

4. 2

5. 3

6. 4

7. 4

7.1 5
7.2 6
7.3 6
7.4 6
7.5 7
7.6 7
7.7 7
7.8 7
7.9 8
7.10 8

8. 9

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

1. INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite la producción (amplificación) rápida de millones a miles de millones de un segmento específico de ADN, que así se podrá estudiar en mayor detalle. La PCR implica el uso de fragmentos cortos de ADN sintético, denominados cebadores, para seleccionar un segmento del genoma que se amplificará, y luego múltiples sesiones de síntesis de ADN para amplificar ese segmento. Las pruebas de PCR son una forma rápida y muy precisa de diagnosticar ciertas enfermedades infecciosas. Las pruebas detectan el ADN o el ARN de un patógeno o células anormales en una muestra.
INgene q Lawsonia intracellularis es un kit de PCR en tiempo real adecuado para la detección y/o cuantificación de Lawsonia intracellularis (L. intracellularis) ADN en muestras biológicas de interés clínico de Porcino de forma sencilla, con alta sensibilidad y especificidad.
El ensayo es adecuado para los siguientes tipos de muestras: heces, hisopos rectales, intestino y cepas/vacunas.

2. PROPÓSITO

El presente procedimiento está elaborado según el kit INgene q Lawsonia Intracellularis Real Time PCR (TaqMan Technology).

3. ALCANCE

Este documento se tomará como referencia única para la detección *Lawsonia intracellularis* utilizando Tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), d
e acuerdo con los numerales 7.2.1 Selección y Verificación de Métodos y 7.7 Aseguramiento de la Validez de los Resultados Norma ISO/IEC 17025:2017.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa

Test para la detección de *Lawsonia intracelular* por la amplificación genética enzimática en tiempo real. (PCR TEST). R.11.LAW.K.5/50 50 Reactions R.11.LAW.K.5/100 100 Reactions.

Euzeby J.P (1995). L'étiologie des entérites prolifératives du porc. Revue générale. Revue méd. Vét 146, 623-630.

Jones G, Ward G, Murtaugh M, Lin G and C Gebhart (1993). Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis in faeces by polymerase chain reaction J. Clin. Microbiol 31 (10), 2611-2615.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Lawson G, Mackie R, Smith D and S McOrist (1995). Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont intracellularis depends on host cell function and actin polymerisation. Vet Microbiol. 45, 339- 350.

Mc Orist S, Gebhart C and G Lawson (1994). Polymerase chain reaction for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. Vet microbiol 41, 205-212.

5. DEFINICIONES

ANTIGENEMIA: Es la técnica de determinación de antígenos **virales** por inmunofluorescencia en leucocitos.

CEBADOR O PRIMER: Segmento corto de ADN que se aparea a una cadena simple de ácido nucleico y sirve de punto de partida para la síntesis de una cadena complementaria, en presencia de nucleótidos y la enzima ADN polimerasa.

CÓDIGO GENÉTICO: Conjunto de reglas por el cual cada codón (triplete de nucleótidos) en el ARN codifica para un determinado aminoácido en las proteínas.

CODÓN Secuencia de tres nucleótidos en una molécula de ARNm (ARN mensajero) que se aparea (forma enlaces puentes de hidrógeno) con el anticodón complementario del ARNt (ARN de transferencia. Cada codón codifica para un aminoácido, salvo tres codones para los cuales no hay aminoácidos posibles y que por lo tanto señalan la terminación de la síntesis proteica (traducción).

FLUORÓFORO: Es un componente de una molécula que hace que esta sea fluorescente.

GEN Unidad física y funcional del material hereditario que se transmite de generación en generación. Desde el punto de vista molecular, es la secuencia de ADN completa necesaria para la producción de una proteína o un ARN funcional.

GENOMA: Toda la información genética contenida en una célula u organismo.

HIBRIDACIÓN: En biología molecular, asociación de dos cadenas de ácidos nucleicos complementarias para formar una cadena doble que contenga dos cadenas de ADN, dos cadenas de ARN o una de ADN y una de ADN. Se emplea para detectar secuencias específicas de ADN o ARN.

NUCLEÓTIDO: Monómero de los ácidos nucleicos, formado por un nucleósido unido a uno o más grupos fosfato.

QUENCHER: El **quencher** inhibe la fluorescencia del fluoróforo cuando es excitado por la fuente de luz del Termociclador. De esta forma, mientras que el fluoróforo y el **quencher** estén próximos el uno al otro, no habrá señal fluorescente, puesto que el **quencher** está ejerciendo su actividad inhibidora.

REPLICACIÓN: Proceso por el cual se autoduplica el ADN, generando una molécula idéntica a otra preexistente (molde).

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

RT-PCR: La reacción de PCR en unión con la transcripción reversa (RT-PCR). Puede ser utilizada para el estudio de ARNm casi a nivel de una célula individual. Sirve para determinar la presencia o ausencia de un transcripto, para estimar el nivel de su expresión y para el clonado de ADNc sin la necesidad de construir una genoteca.

SECUENCIA de ADN: Orden de las bases nitrogenadas en el ADN que determina la información genética.

SECUENCIACIÓN DEL ADN: Técnica que permite conocer la secuencia exacta de un fragmento de ADN.

TEMPLATE (DNA): Hebra del ADN dúplex que actúa como molde para la transcripción (ADN TEMPLADO)

TRANSCRIPCIÓN: Proceso por el cual una cadena de ADN es usada como molde para la síntesis de un ARN complementario por acción de la enzima ARN polimerasa.

TRANSCRIPTASA REVERSA O INVERSA: Enzima que sintetiza ADN a partir de un molde de ARN, el cual se duplica posteriormente para dar la doble cadena de ADN. Frecuente en retrovirus y también empleado en ingeniería genética para generar ADN complementario (ADNc).

6. PATOGENIA

Enteropatía proliferativa (EP), también conocida como ileítis proliferativa, causada por la obstrucción intracelular obligada. Es una enfermedad de amplia distribución mundial. Se ha informado en una variedad de especies que incluyen cerdos, caballos, conejos, hámsteres.
La enfermedad tiene dos manifestaciones clínicas en los cerdos: una forma hemorrágica aguda a menudo denominada enteropatía hemorrágica porcina (PHE) y una forma proliferativa más crónica a menudo denominada adenomatosis intestinal porcina (API).
Los casos de enteropatía hemorrágica aguda ocurren con mayor frecuencia en adultos jóvenes de 6 a 20 meses de edad, pero los animales mayores también pueden verse afectados.
Dado que la EP ataca la parte inferior del intestino delgado (íleon), afecta la digestión y puede provocar signos clínicos. Pueden producirse heces sueltas o diarrea acuosa junto con pérdida de apetito, pérdida de peso y anemia.
Histológicamente, los tejidos afectados muestran una marcada proliferación de células epiteliales de las criptas intestinales. La magnitud de la proliferación varía ampliamente, pero en las lesiones desarrolladas la pared está visiblemente engrosada y el diámetro total aumentado.
Lawsonia intracellularis aún no se ha cultivado en medios libres de células (Lawson et al., 1995). La necropsia y los exámenes de laboratorio se aplican con frecuencia para diagnosticar la EP. La detección por PCR de *Lawsonia intracellularis* en materia fecal es la única prueba que permite la detección de bacterias en cerdos vivos. La prueba PCR es también la prueba más sensible para detectar *Lawsonia intracellularis* en la mucosa intestinal.

7. DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA

INgene q Lawsonia intracellularis es un ensayo para la amplificación y detección del material genético de L. intracellularis basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el uso de sondas de hidrólisis (tipo TaqMan) para la detección de la fluorescencia de los productos amplificados. El kit contiene todos los reactivos y

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

enzimas necesarios para amplificar y detectar simultáneamente material genético de L. intracellularis en muestras de ácidos nucleicos extraídos. Los reactivos se incluyen en una mezcla de ensayo lista para usar, que está en concentraciones óptimas para detectar (y opcionalmente cuantificar) el material genético de L. intracellularis, simplemente agregando el extracto de ácidos nucleicos de la muestra problema.
Este kit contiene cebadores específicos y una sonda marcada con fluorocromo FAM para la detección de L. intracellularis a 530 nm. Además, la mezcla de ensayo incluye un control endógeno (EC) que se amplifica con cebadores específicos y detectados con una sonda marcada con HEX/VIC, lo que permite identificar falsos negativos por inhibición de la PCR.

El kit incluye un control positivo sintético de L. intracellularis para la detección y, opcionalmente, realiza pruebas relativas/absolutas de cuantificación. Este control podría usarse para generar una curva estándar para correlacionar el número de copias del patógeno con el valor del umbral del ciclo de cuantificación (Cq).
El kit ha sido validado en las siguientes plataformas PCR: QuantStudio 5 Dx System de Applied Biosystems y CFX96™ Sistema de PCR en tiempo real de Bio-Rad. Es compatible con otros termocicladores, si tienen los canales de fluorescencia adecuada, pero los valores de Cq pueden variar entre ellos.

7.1 Composición del Kit.

Componentes	Descripción	N° Viales	Volumen / Vial
INgene q Lawsonia intracellularis Tubo de mezcla de ensayo	Buffers, enzima, dNTPs, cebadores/sondas para la detección de L. intracellularis y Control endógeno CE	1 o 2[1]	750 µl
PC10[2] Control Positivo	Control sintético específico liofilizado	1[3]	Liofilizado
Agua	Agua libre de nucleasas	1	1ml

[1] 1 vial para formato de 50 reacciones y 2 para formato de 100 reacciones.

[2] Reconstituir el control positivo como se describe a continuación:

1. Girar brevemente el tubo PC y reconstituir con 250 µl de agua libre de nucleasas.
2. Para facilitar la resuspensión, mantenga el tubo durante 10 min a temperatura ambiente.
3. Mezclar suavemente el tubo en el vórtex antes de usarlo.
4. Conservar PC reconstituido a ≤-18ºC

[3] Consultar el Certificado de análisis (CoA) para obtener el número de copias.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

7.2 Conservación de los componentes del Kit.

Todos los componentes deben almacenarse a ≤-18ºC inmediatamente después de su llegada y hasta el momento de su uso y protegidos de la luz. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de caducidad.

Ver el Certificado de Análisis.

7.3 Materiales y equipos requeridos, pero no suministrados

- Guantes desechables sin polvos.
- Microcentrífuga.
- Vórtex
- Termociclador tiempo real.
- Micropipetas (2-1000 µl) y puntas de pipeta estériles (con filtro).
- Cubos de hielo o bloques de enfriamiento.
- Microtubos estériles.
- Placas o tubos de qPCR con tapas/sellado óptico compatible con el Termociclador.

7.4 Normas de trabajo y precauciones para evitar la contaminación

Observar cuidadosamente las siguientes pautas de trabajo:

- Limpiar las superficies del área con etanol al 70%.
- Esperar 5 minutos.
- Limpiar las superficies del área con NucleasEliminator.
- Dejar el producto actuando durante 5 minutos.
- Enjuagar muy bien con agua libre de nucleasas.

Este producto se puede usar de forma segura en todas las superficies del laboratorio, desde cristalería, tubos de Microcentrífuga, puntas de pipeta y unidades de electroforesis, actúa eliminando y desactivando incluso altas concentraciones de contaminación por nucleasas de superficies de vidrio o plástico.

- Utilizar materiales libres de nucleasas/grado molecular y puntas con filtro estériles.
- Asegurar la refrigeración y una buena homogeneización de los componentes del kit una vez descongelados.
- Evitar los ciclos repetidos de congelación y descongelación de los componentes del kit, ya que se puede reducir su rendimiento.

Precauciones especiales para evitar contaminaciones ambientales o cruzadas que puedan causar falsos positivos:

- Utilizar al menos dos áreas de trabajo separadas con material dedicado y flujo de trabajo unidireccional: (1) Extracción de los ácidos nucleicos y (2) área de amplificación/detección.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- ***El control positivo de PCR debe almacenarse por separado del resto de reactivos del kit***. Durante la configuración de qPCR, manipular y dispensar el control positivo en último lugar, evitando cualquier contacto con los demás componentes del kit.

7.5 Recolección y transporte de muestras

Las muestras deben recolectarse y manipularse con cuidado para evitar la contaminación y deben llegar al laboratorio de análisis lo antes posible, siguiendo la normativa nacional para su transporte. Las muestras deben enfriarse desde el momento en que se obtienen y durante el transporte hasta su procesamiento. El procesamiento debe ocurrir dentro de las 24 horas posteriores a la obtención de las muestras. En caso de que se prevea un tiempo más prolongado, se recomienda su congelación.

7.6 Extracción de Ácidos Nucleicos.

Se podría utilizar cualquier procedimiento de extracción que proporcione una buena calidad del material extraído. Paralelamente a la extracción del material genético de las muestras, se recomienda realizar un simulacro de extracción, en el que se sustituye la muestra biológica por agua libre de nucleasas, para comprobar posibles contaminaciones durante el procedimiento de extracción.

PRECAUCIÓN: Si no se va a realizar la amplificación inmediatamente, conservar el ADN a ≤-18ºC.

7.7 Control Endógeno

La detección de control endógeno (EC) permite la evaluación del muestreo, la extracción de ácido nucleico y la ejecución de qPCR y, por lo tanto, identifica la presencia de resultados falsos negativos. El tubo de mezcla de ensayo incluye un conjunto específico de cebadores y sonda para un gen de control endógeno presente en todas las células animales. Este objetivo se detecta a través del canal HEX o VIC y sus rangos Cq están entre 22-37.

Al analizar aislamientos de cepas microbiológicas, se recomienda la adición de un control exógeno.

La amplificación de esta EC no interfiere con la detección del ADN diana de L. *intracellularis* incluso cuando está presente en bajo número de copias.

7.8 PCR Cuantitativa Cualitativa

El kit se puede utilizar para PCR en tiempo real cuantitativa o cualitativa. Un control positivo específico de L. *intracellularis* con un determinado número de copias (ver CoA) se suministra con el kit.

Para realizar una PCR en tiempo real cuantitativa, se debe preparar una curva estándar.
Para preparar la curva estándar, hacer 6 diluciones (10^{-1} a 10^{-6}) del PC (control positivo) reconstituido en agua libre de nucleasas. (Por ejemplo, diluyendo 50 µl de PC en 450 µl de agua libre de nucleasas). Mezclar minuciosamente con el vórtex y cambiar la punta de la pipeta entre cada dilución serial.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Para el análisis de la curva estándar, pipetear 5 µl de cada dilución en cada pocillo, de acuerdo con la configuración de la placa. Realizar 2-3 repeticiones de cada dilución para obtener datos de cuantificación más fiables. Para la cuantificación no utilizar un PC congelado descongelado más de 3 veces. La curva estándar no es necesaria para realizar una PCR en tiempo real cualitativa.

7.9 Amplificación de Material Genético

1. Descongelar el tubo de mezcla de ensayo que necesita según la cantidad de reacciones requeridas. El tubo de ensayo de mezcla no utilizado debe permanecer congelado.
2. Mezclar brevemente con el vórtex.
3. Dispensar 15 µl del tubo de mezcla de ensayo en cada pozo/tubo utilizado para el ensayo.
4. Añadir 5 µl de muestra de ácido nucleico o control (PC o control negativo (agua) o control de extracción negativo) en los pozos/tubos correspondientes utilizados para el ensayo.
5. Sellar los pozos/tubos con su correspondiente film o tapones.
6. Centrifugar suavemente las placas/tubos antes de insertarlos en el Termociclador para evitar caídas en las paredes del pozo.

Perfil Térmico	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Pre-PCR (Paso RT)[4]	45	15 min	1
Desnaturalización	95	5 min	1
Amplificación	95	15 s	42
	60[5]	60 s	

[4] El paso RT debe incluirse en aquellos ensayos dirigidos a patógenos de ARN. Para objetivos de ADN, este paso no es necesario y puede ser omitido.
Los kits INgene PCR y RT-qPCR que se proporcionan en un formato listo para usar comparten el mismo perfil térmico de PCR.
Por lo tanto, se pueden ejecutar juntos mediante el protocolo RT-qPCR.

[5] Los datos de fluorescencia deben recopilarse durante este paso a través de los canales FAM (L. intracellularis) y HEX/VIC (EC).
Desmarcar ROX como referencia pasiva en aquellos equipos que tengan este canal seleccionado por defecto.

7.10 Análisis e Interpretación de Resultados

MUESTRA (FAM) Positivo si Cq ≤ 38	CONTROL POSITIVO (FAM)	CONTROL NEGATIVO (FAM)	MUESTRA Control Endógeno (HEX)	RESULTADO DEL ENSAYO
POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NO CONSIDERAR[6]	VÁLIDO
				VÁLIDO

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	
NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO[7]	NO VÁLIDO
POSITIVO/NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO/NEGATIVO	NO VÁLIDO
POSITIVO/NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO/NEGATIVO	NO VÁLIDO

[6] No considerar la señal de EC en muestras o control positivos.

[7] Evaluar la pureza y la concentración de la muestra. Si es necesario, prepare diluciones de diez veces (10^{-1} a 10^{-2}) de esta muestra y vuelva a probar el ensayo qPCR.
En caso de persistencia de resultados negativos en EC, es necesaria una nueva extracción de ácido nucleico.

8. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha de Revisión	Versión	Descripción del cambio	Responsable
Marzo 4 de 2023	001	Se actualiza todo el documento con el inserto del nuevo Kit INgene q Lawsonia Intracellularis Real Time PCR (TaqMan Technology).	Jeanethe Rojas R. Gerente de Calidad.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

1. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos son proteínas producidas por la respuesta inmune para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias y virus. El anticuerpo típico está constituido por dos unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño y son sintetizados por un tipo de leucocito denominado linfocito B. Los anticuerpos pueden presentarse en distintas variedades conocidas como isotipos o clases. Existen cinco isotipos de anticuerpos conocidos como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Se nombran mediante el prefijo "Ig" que significa inmunoglobulina y difieren en sus propiedades biológicas, localizaciones funcionales y capacidad para reconocer diferentes tipos de antígenos.

Las pruebas inmunológicas pueden ser utilizadas para varios propósitos: diagnóstico, prevención, vigilancia activa, elección de momentos de vacunación, seguimiento de programas vacunales, determinación de estatus sanitarios, calcular indicadores de protección, entre otros; es por esto que el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab tiene implementadas pruebas de diagnóstico por diferentes métodos inmunológicos de ensayo que contribuyen a facilitar la detección de enfermedades de importancia en sanidad y producción animal.

2. PROPÓSITO

Unificar las instrucciones de realización de los diferentes métodos inmunológicos de ensayo realizados en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.

3. ALCANCE

Este documento se tomará como referencia única para la realización de pruebas diagnósticas de Rumiantes en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.

De acuerdo con los numerales 7.2.1 Selección y Verificación de Métodos y 7.7 Aseguramiento de la Validez de los Resultados Norma ISO/IEC 17025:2017.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, L. y col. Universidad de León – Universidad Santiago de Compostela Universidad de Zaragoza Patología médica veterinaria. Sangre y sistema inmunitario, 2003

- BIO-X Diagnostics. Monoscreen ELISA. Kit ELISA para serodiagnóstico del virus de la parainfluenza 3 bovina (BPI3). Ensayo indirecto para sueros sanguíneos, plasma y leche. Prueba diagnóstica para el ganado. Pozos dobles V 2.2 (23/10/2015)

- Clinton, N.J. Methods in molecular biology. Methods Mol Biol. 2015; 1318:61-7. doi: 10.1007/978-1- 939-2742-5_6.

- Gómez, Esperanza y Col. Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunológicas. Recursos Educativos Serie Veterinaria 3(15):94-121, 2011 ISSN: 1989-5003

- INTA Curso de Técnicas de Diagnóstico en Virología Animal Instituto de Virología - C.I.C.V. –INTA

- OIE. MANUAL DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y DE LAS VACUNA PARA LOS ANIMALES TERRESTRES 2013. Organización mundial de sanidad animal (OIE)

- Universidad Autónoma del Estado de México. Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología. Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Actualización 2013. Recuperado en http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_974_MP%20Virolog%C3%ADa.pdf

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

5. DEFINICIONES

- **ANTICUERPOS:** Proteínas producidas por el sistema inmunológico para identificar y neutralizar las sustancias dañinas y/o extrañas a un individuo (antígenos). Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B.

- **ANTICUERPOS MONOCLONALES**: anticuerpo homogéneo producido por un clon de células. Este clon está derivado de una célula híbrida, creada a partir de la fusión de una sola célula madre del sistema inmune y una célula plasmática tumoral. Este clon de linfocitos B fabrica anticuerpos idénticos y específicos para un antígeno. Con esto se consigue producir anticuerpos monoclonales, muy útiles y utilizados en biomedicina y en biología molecular. En medicina se utilizan, por ejemplo, para detectar la presencia y cantidad de una sustancia en la sangre.

- **ANTÍGENO:** Sustancia extraña y/o dañina que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.

- **INMUNIDAD CELULAR**: Proceso de respuesta inmunológica en la que intervienen las células inmunológicamente competentes: fagocitos, células T y macrófagos. El sistema actúa fagocitando la célula infectada y destruyendo el parásito y la célula hospedadora.

- **INMUNIDAD HUMORAL**: Principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, en el cual, los componentes del sistema inmunitario que atacan a los antígenos, no son las células directamente sino son macromoléculas, como anticuerpos o proteínas del sistema del complemento

- **INMUNOLOGÍA:** Estudio de las respuestas inmunes y sus consecuencias.

- **RESPUESTA INMUNE:** Conjunto de mecanismos fisiológicos que permiten al animal reconocer sustancias extrañas a su organismo, neutralizarlas y eliminarlas o metabolizarlas, con o sin lesión de los tejidos

- **SEROCONVERSIÓN:** Demostración de la presencia de anticuerpos específicos para un antígeno concreto en el suero de un individuo, previamente negativo para dicha especificidad antigénica.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

6. ELISA

El método ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es un inmunoensayo en el que a una fase sólida se ancla un antígeno o anticuerpo conocido, el cual es capaz de fijar un anticuerpo (si está anclado un antígeno) o un antígeno (si está anclado un anticuerpo) desde una muestra problema, a la reacción antígeno- anticuerpo se agrega un conjugado (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima que posteriormente genera un producto detectable colorimétricamente desde un substrato. Se usa para detección de anticuerpos y de antígenos (infecciosos, moleculares, hormonas, etc.), esto permite establecer ausencia o presencia de una infección o de una sustancia. Es un método de ensayo versátil, robusta y relativamente simple con aplicación en el diagnóstico clínico, la detección viral, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc. Existen diferentes tipos de ELISA:

- **ELISA DIRECTA**: Para detección de antígeno. En la fase sólida se encuentran anticuerpos que pueden detectar el antígeno buscado. El conjugado puede estar constituido por anticuerpos marcados o por antígenos marcados (similares a los buscados), en este último caso se genera competencia entre los antígenos de la muestra y los antígenos marcados por el anticuerpo. Los pasos básicos son: incubación de la muestra-anticuerpo, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

- **ELISA INDIRECTA:** Para detección de anticuerpos. En la fase sólida se encuentran antígenos que pueden detectar el anticuerpo buscado. El conjugado está constituido por anticuerpo marcado anti IgG especie específica que se une al anticuerpo anclado al antígeno. Por la naturaleza del conjugado esta prueba es mono especie. Los pasos básicos son: incubación de la muestra-antígeno, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

- **ELISA DE BLOQUEO**: Para detección de anticuerpos. En la fase sólida se encuentran antígenos que pueden detectar el anticuerpo buscado en la muestra. En un primer paso de incubación los anticuerpos presentes en la muestra bloquean el antígeno. Posteriormente se agrega conjugado que está constituido por anticuerpos anti antígeno marcados, que compiten por el antígeno con los anticuerpos presentes en la muestra. Por la naturaleza del conjugado esta prueba es multiespecie. Los pasos básicos son: incubación de la muestra-antígeno, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

- **ELISA COMPETITIVA**: Para detección de anticuerpos. El funcionamiento de esta prueba es similar a la ELISA DE BLOQUEO, la diferencia es que posterior al primer paso de incubación de muestra-antígeno no se realiza lavado, sino que se agrega conjugado para que compita por el antígeno con la muestra. Es una prueba multiespecie.

- **ELISA DE DOBLE RECONOCIMIENTO**: Para detección de anticuerpos. En la fase sólida se encuentran antígenos que pueden detectar el anticuerpo buscado. El conjugado está constituido por antígeno marcado que puede unirse al anticuerpo ya anclado al primer antígeno. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Por la naturaleza del conjugado esta prueba es multiespecie. Los pasos básicos son:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

incubación de la muestra-antígeno, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

Para la realización de este método de ensayo es necesario seguir las siguientes instrucciones:

- Leer y seguir cuidadosamente las instrucciones de cada método analítico suministradas por el fabricante.
- Usar los kits solamente para diagnóstico in vitro
- Almacenar los kits de reactivos entre 2 y 8°C
- Estabilizar todos los reactivos al menos una hora a temperatura 18-25°C antes de cada uso.
- Se debe verificar ausencia de cristales de precipitación en las soluciones diluyentes y soluciones de lavado. Si se observan cristales, se pueden disolver calentando los recipientes que contienen dichas soluciones a 37°C.
- El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al bote.
- El substrato y la solución de parada deben manipularse con precaución. Se debe evitar contacto con piel, ojos y mucosas. En caso de accidente, enjuagar con abundante agua de grifo.
- No mezclar componentes de diferentes lotes de kits.
- Se debe evitar la contaminación de los reactivos.
- El material de vidrio utilizado durante la ejecución de los ensayos debe estar limpio, sin resto de detergentes.
- No utilice agua que pueda contener oxidantes (por ejemplo, hipoclorito de sodio) o sales de metales pesados, ya que estas sustancias pueden reaccionar con el cromógeno.
- Desechar todas las soluciones contaminadas con bacterias y/o hongos.
- Todos los materiales y equipos desechables que entran en contacto con las muestras deben ser considerados potencialmente infecciosos y eliminados de acuerdo con la legislación vigente en el país.
- Para garantizar la fiabilidad de los resultados, se deben seguir los protocolos.
- Se debe tener especial cuidado en observar los tiempos y temperaturas de incubación, así como medir los volúmenes y las diluciones con precisión.
- Recuerde que algunos componentes de los kits de reactivos son de origen animal, es decir representan riesgo biológico, igualmente otros componentes son sustancias de riesgo químico, así que deben contemplarse las medidas de bioseguridad.
- **NO OLVIDE MARCAR TODOS LOS ELEMENTOS QUE UTILICE DURANTE LA PRUEBA:** Esto incluye recipientes para dispensación /preparación de reactivos, muestras, placas de predilución y placas con antígeno.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS: Cada casa comercial establece los criterios de interpretación de los resultados, los cuales serán informados de acuerdo a dichos criterios.

6.1. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DEL MÉTODO:** Los resultados son válidos cuando cumplen los criterios de validación de cada casa comercial.
- Se deben realizar cartas de control para cada prueba realizada, para cada tipo de control, para cada y para cada analista, en el LBFMT013 Carta Control Ensayos.
- No se deben mezclar reactivos de diferentes lotes para el montaje de pruebas.
- Se realizará confirmación del método de acuerdo al LBPOE009 Aseguramiento de la Validez de los

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Resultados.

- Cada vez que ingrese un nuevo analista y de acuerdo a la DEFMT014 Plan de Trabajo Sistema de Gestión, la supervisión de métodos se debe realizar y registrar en el LBFMT095 Supervisión Métodos Analíticos e informar a la Gerencia General que realizará la autorización siguiendo lo definido en el THPOE001 Relación Contractual.
- En esta prueba es de gran importancia el control de la temperatura y del pH del agua destilada/ desionizada, por esta razón se deben controlar estas dos variables de acuerdo a los procedimientos establecidos por el laboratorio para este fin.
- Diligenciar en cada montaje el LBFMT060 Hoja de Trabajo ELISA.
- Si se evidencian servicios no conformes durante la ejecución del ensayo, se debe registrar en el campo "Observaciones" de las hojas de trabajo la fecha de registro en el LBFMT026 Registro y Tratamiento de SNC.

6.2. RECURSOS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS

- **Equipos:**

  - Lector de ELISA para microplacas de 96 pozos con filtros de longitud de onda 405nm, 450nm y 630nm
  - Incubadora - agitador de ELISA (Temperatura de uso 37 +/-1°C)
  - Agitador de tubos (Vórtex)
  - Lavador de Microplacas ELISA (Opcional)
  - Refrigerador 2-8°C
  - Cabina de Seguridad Biológica Tipo IIA
  - Centrifuga con protección para aerosoles
  - Micro pipeta multicanal de volumen ajustable en el rango 5 a 50ul
  - Micro pipeta multicanal de volumen ajustable en el rango hasta 200 ul o máximo hasta 350ul
  - Micro pipeta mono canal de volumen ajustable en el rango hasta 100 ul
  - Micro pipeta mono canal de volumen ajustable en el rango 100 a 1000 ul
  - Termómetros para medición de temperatura ambiente y para medios isotermos.
  - Cronómetro con alarma audible
  - Pipeteador

- **Insumos**

  - Puntas nuevas para pipetas de 5-300ul
  - Puntas nuevas para pipetas de 100 – 1000 ul
  - Reservorios (Canaletas) para reactivos
  - Placas inertes de ELISA fondo plano
  - Probeta de 100 ml
  - Probeta de 500ml
  - Probeta de 1000ml
  - Pipeta de 1ml
  - Pipeta de 5ml
  - Pipeta de 10ml
  - Agua destilada o desionizada

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- **Reactivos:**

  - Kit de reactivo de cada ensayo: con certificados de análisis.

- **Material De Referencia:**

Sueros de Referencia Nacional o secundarios Positivos y Negativos. Si no hay disponibilidad de Sueros de Referencia Secundarios, utilizar sueros de referencia de trabajo preparados en el laboratorio; la caracterización de estos sueros se encuentra en el formato LB FMT 112 Ficha Técnica Material de Referencia.

El procesamiento del material de referencia se lleva a cabo en el caso que exista: un cambio de analista, cada vez que se comience un kit con lote nuevo y en el caso de que la prueba se deje de realizar en un periodo de meses, se realiza un control de resultados en el formato LB FMT 013 Cartas Control.

- **Elementos De Protección Personal:**

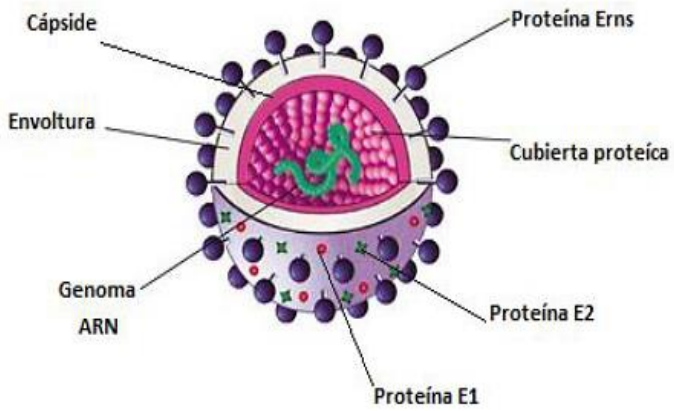
  - Uniforme.
  - Guantes de látex/ Nitrilo
  - Gorro.
  - Tapabocas.
  - Zapato antideslizante
  - Careta

7. BOVINOS, BUFALINOS, OVINOS Y CAPRINOS

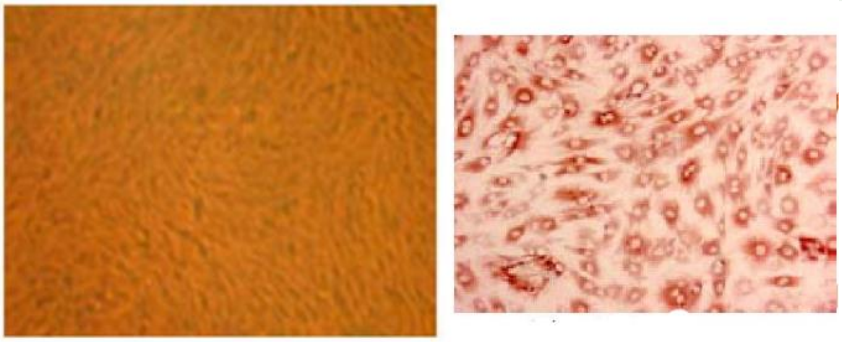
7.1 DIARREA VIRAL BOVINA (DVB)

Es una enfermedad causada por un virus del género pestivirus de la familia Flaviviridae. Presenta forma esférica con un diámetro entre 40 a 60nm y está constituido por una cápside icosaédrica, rodeado de una envoltura lipoprotéica proveniente de la membrana celular. Está constituido por 3 proteínas de envoltura (Erns, E1 y E2) y la proteína de la cápside viral la cual empaqueta el ARN genómico.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

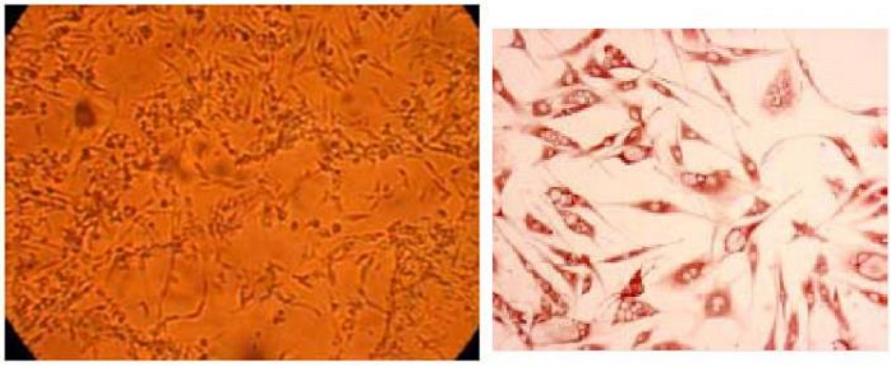


Se pueden distinguir asimismo los biotipos del virus, uno citopático (CP) que causa efecto citopático en cultivo celulares, no genera animales PI e induce apoptosis de las células infectadas y otro no citopático (NCP) que no produce efecto citopático en cultivos celulares, genera animales PI y no induce apoptosis en células infectadas (inhibe INF-I). Las cepas pueden mutar del biotipo NCP al CP. El VDVB presenta un grado muy alto de variabilidad genética y pueden producirse recombinaciones entre cepas.



Cepa No citopática

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



Cepa citopática

La enfermedad puede provocar síntomas comunes (fiebre, falta de apetito, letargo) y afectar además a los sistemas inmunitario, respiratorio, reproductor y digestivo.

- Úlceras en la boca y el tubo digestivo, así como diarrea hemorrágica. Puede producirse una diarrea "tradicional", pero es raro.
- Disminución del rendimiento reproductivo.
- Inmunosupresión que está al origen de las enfermedades respiratorias e intestinales del ternero.
- El VDVB también puede atravesar la barrera placentaria de una vaca gestante e infectar al feto, provocando muertes embrionarias, abortos espontáneos y mortalidad perinatal. Muy importante es su capacidad de provocar el nacimiento de animales persistentemente infectados (PI) que a menudo pueden pasan desapercibidos y que constituyen una gran fuente de infección para el rebaño.

Los factores más importantes en los programas para reducir o eliminar el VDVB son las vacunas, los análisis y la bioseguridad. El objetivo principal de la vacunación de los animales reproductores contra el VDVB es prevenir el nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI), por el riesgo epidemiológico que estos terneros representan para los otros animales del rebaño.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

7.1.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS



1 **Infección aguda**

Fiebre, complicaciones respiratorias y/o entéricas, leucopenia y trombocitopenia, secreción nasal y ocular.



2 **Animales PI**

Depende del estado inmune. Son virémicos durante toda su vida y son inmunotolerantes al VDVB.



3 **Enfermedad de las mucosas**

Diarrea sanguinolenta, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias constantes y leucopenia..

7.1.2 DETERMINACIÓN ACS ANTI DVB POR ELISA

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo de rumiantes	Determinación de anticuerpos anti virus Diarrea Viral Bovina en muestras biológicas de suero sanguíneo de rumiantes por el método ELISA de competición.	INgezim PESTIVIRUS Compac R.12.BVD.K3 Última revisión / Last revisión: 02-0218 # 1054RD

a. <u>Descripción</u>

Ensayo inmunoenzimático de competición para la detección de anticuerpos específicos frente a Pestivirus de rumiantes (BVDV y BDV) en muestras de suero. En la placa de poliestireno se encuentra fijado el antígeno viral inactivado. Cada muestra de suero a ensayar, se dispensa en uno de los pocillos cubiertos con antígeno. En el

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

caso de contener anticuerpos frente a Pestivirus, estos se unirán al antígeno de la placa "Ocupando los determinantes antigénicos específicos". Por el contrario, si no contiene anticuerpos frente a Pestivirus, los determinantes antigénicos específicos, permanecerán "libres".

Para poder revelar las reacciones acontecidas en los pocillos, se utiliza un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa específico para la proteína P80/ P125 de Pestivirus. Este conjugado se añade a cada uno de los pocillos ensayados y "ocuparán" los determinantes antigénicos que hayan quedado libres tras la incubación con el suero problema. Después de eliminar mediante lavados todo resto de material no adherido, y añadiendo a cada pocillo el sustrato adecuado a la peroxidasa, se observará la aparición de una reacción coloreada, allí donde los conjugados hayan encontrado epítopos específicos sin ocupar por los anticuerpos del suero problema.

De este modo los sueros negativos presentarán reacción coloreada en el pocillo a ensayar y los sueros positivos no presentarán esta reacción.

b. Precauciones

- ✓ Leer atentamente las instrucciones de uso
- ✓ Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
- ✓ No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits
- ✓ Evitar cualquier contaminación de los reactivos
- ✓ No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
- ✓ No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
- ✓ No pipetear los reactivos con la boca.
- ✓ Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
- ✓ Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit

IMPORTANTE: El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las condiciones externas, por lo que se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.

La solución de frenado es una solución fuerte, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.

c. Composición del Kit de Elisa

REACTIVO	5 PLACAS	
	Unid	Vol.
Placas de micro titulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo	2 viales	400ul
Viales conteniendo suero Control Negativo	2 viales	400ul
Viales conteniendo conjugado (AcM anti p-80/p125) de Peroxidasa concentrado 100x	2 viales	200ul
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1 frasco	125ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-01)	2 frascos	125ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso	1 frasco	60ml
Frascos conteniendo solución de frenado	1 frasco	60ml

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

d. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-300ul
- Puntas de Micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas
- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 450nm)

e. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y +8ºC) Una vez abiertos, los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizaciones.

f. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una Micro pipeta que permita dispensar la cantidad de 300µL por pocillo. Tras las incubaciones realizar los lavados según las siguientes instrucciones.

PASO 1. Eliminar el contenido de la placa volteándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre pocillos.

PASO 2. Distribuir unos 300µL de solución de lavado por pocillo.

PASO 3. Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

PASO 4. Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido

PASO 5. Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento

PASO 6. Antes de eliminar el contenido del ultimo lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.

PASO 7. Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel absorbente.

g. Preparación De Las Muestras

Para realización de screening, los sueros se utilizarán a la dilución 1/5. (20µL de suero + 80µL de diluyente del suero) es la cantidad necesaria para cada pocillo. En el caso de titulación se realizarán diluciones de factor 2 a partir de la dilución 1/5. **Los controles deben tratarse como las muestras.**

h. Preparación De Los Reactivos

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 1: **Solución de lavado:** Diluir un volumen de solución concentrada en 24 volúmenes de agua destilada, (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua). Una vez preparada la solución permanece estable mantenida entre +2ºC y+8ºC.

PASO 2: Preparación del conjugado: A realizar inmediatamente antes de su utilización: Realizar una dilución 1/100 en diluyente. Para una placa la cantidad necesaria y suficiente es: 60µL de conjugado en 6ml de diluyente. Para una tira la cantidad necesaria y suficiente de conjugado es: 5µL de conjugado en 0,5ml de diluyente. Agitar muy bien la solución antes de su utilización. Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

i. Procedimiento

PASO 1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (Excepto el conjugado) a temperatura ambiente.

PASO 2. Dispensar 20µL de los sueros controles y de las muestras + 80 µl de diluyente en cada uno de los pocillos de la placa, es recomendable en caso de screening que tanto los sueros controles como los sueros problema se ensayen por duplicado. Tapar la placa e incubar **1 hora a 37ºC**

PASO 3. Sin retirar los sueros, añadir 50µL de conjugado preparado según procedimiento descrito, en cada pocillo. Aplicar la placa suavemente para que se mezclen bien los reactivos, teniendo como precaución que no ocurra intercambio de fluidos entre los pocillos. Mantener **1 hora a temperatura ambiente (25ºC).**

PASO 4. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.

PASO 5. Añadir 100µL de sustrato por pocillo, mantener la reacción **15 minutos a temperatura ambiente** y en oscuridad. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal a fin de agilizar lo más posible este proceso.

PASO 6. Añadir 100µL de solución de frenado, con objeto de parar la reacción. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato. La solución de frenado provocará el cambio de azul a amarillo.

PASO 7. Leer a 450nm en los 5 minutos siguientes a la adición de la solución de frenado.

j. Lectura e Interpretación de Resultados

PASO 1. Validación del test:

El test se considera válido cuando

-Abs (Control+) < 0,4
-Abs (Control-) > 0,8

PASO 2. Interpretación de los resultados

- ✓ **Cálculo de Cutt Off:**

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Cutt Off Positivo = 0,5 x Abs media control negativo
- Cutt Off Negativo = 0,55 x Abs media control negativo.

PASO 3. Interpretación de resultados

Si las muestras se analizan por duplicado, deberá calcularse la media de DO de ambos pocillos, las muestras se consideran positivas cuando su valor de absorbancia sea inferior al Cutt Off positivo, y negativas cuando sea superior al Cutt Off negativo.

Los sueros con absorbancia entre ambos Cutt Off serán considerados dudosos y se recomienda que se ensayen de nuevo en un plazo de tres semanas.

En caso de titulación, el título de la muestra será la mayor dilución cuyo valor de absorbancia sea igual o menor que el Cutt Off positivo.

EJEMPLO:

- Abs media del control negativo: 1,300
- Abs media del control positivo: 0,220
- Cutt Off positivo: 1,300x0,5 = 0,650
- Cutt Off negativo: 1,300x0,55=0,715

Diluciones	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
1/5	0,163	0,291	1,235
1/10	0,176	0,412	1,284
1/20	0,211	**0,567**	1,401
1/40	0,325	0,842	1,180
1/80	0,505	1,055	1,320
1/160	**0,617**	1,330	1,324
1/320	0,897	1,284	1,408
1/640	1,222	1,357	1,260

En este caso las muestras 1 y 2 son positivas con un título de 1/160 y 1/20 respectivamente, mientras que la muestra 3 es negativa.

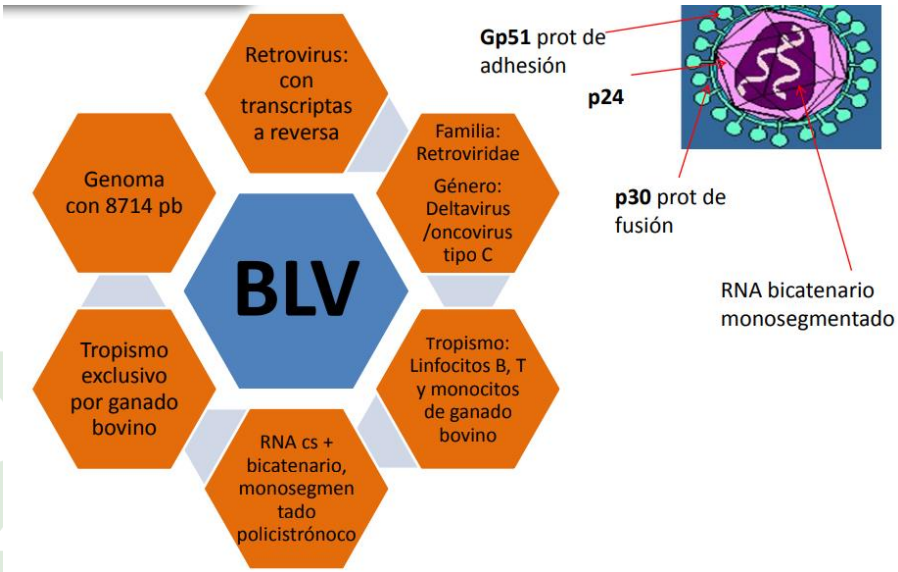
7.2 LEUCOSIS VIRAL BOVINA (LVB) / LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA

La leucosis o leucemia bovina es una enfermedad viral neoplásica que afecta el ganado y se caracteriza por tumores malignos en el tejido linfático (linfosarcomas), el animal presenta baja de pes, baja producción de leche, disminución de la eficiencia de producción de animales, muerte, costos veterinarios y aumento en la tasa de reemplazo.

El agente causal es un oncovirus de la familia *Retroviridae* que se caracteriza por la formación de anticuerpos permanentes. Su incidencia es mayor en los sistemas de producción lechero, por eso países exportadores de lácteos como Australia y Nueva Zelanda tienen programas sanitarios para su control y erradicación. Se caracteriza por la formación de tumores malignos en el tejido linfático.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

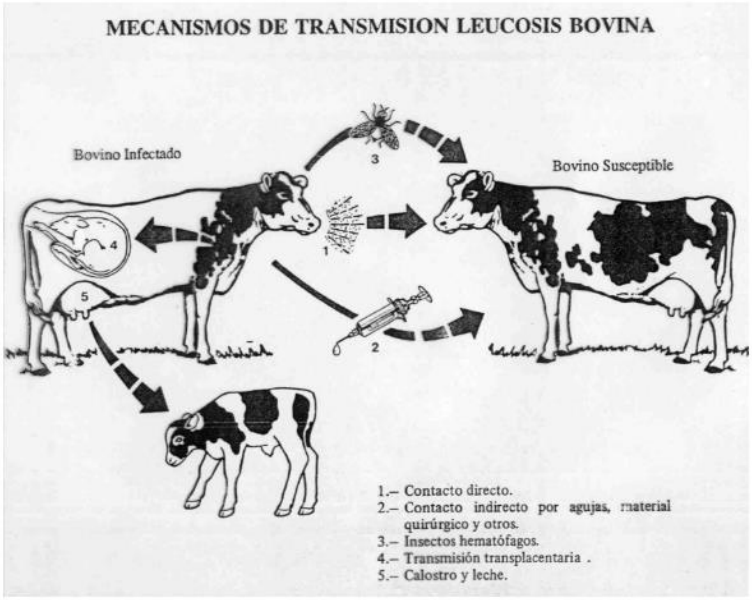
FORMA JUVENIL: Se presenta antes del primer año, involucra casi todos los nódulos linfáticos y órganos viscerales.
FORMA TÍMICA: Bovinos de uno a dos años. Provoca tumor del timo y nódulos linfáticos de cualquier parte del cuerpo.
FORMA ADULTA: Aparece entre los cuatro a ocho años de edad. Localización de los tumores en nódulos linfáticos, riñón, bazo, corazón, cordón espinal en su porción lumbar.



http://www.saludcapital.gov.co/CTDLab/Publicaciones/2016/Virus_Leucosis_Bovina_en_Cancer_de_Mama.pdf

Los signos pueden incluir: alteraciones digestivas, inapetencia, pérdida de peso, debilidad general, disminución de la producción láctea, anemia, manifestaciones neurológicas, baja producción de leche, linfocitosis permanente y postración.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/12064/neosporosis-bovina.html

No existe un tratamiento para la leucosis bovina. Los bovinos infectados albergan el virus durante su vida útil, que sirve como una fuente potencial de infección para otros animales. Los procedimientos recomendados para minimizar la transmisión de BLV incluyen: El uso de agujas desechables y no utilizar la misma aguja para inyecciones en múltiples animales. La desinfección de equipo de tatuaje y los instrumentos quirúrgicos entre los animales. El tratamiento con calor o pasteurización del calostro. El control de moscas que pican (moscas de caballos y las moscas del venado). La comprobación periódica de todos los animales y la eliminación de los animales que tienen anticuerpos contra el virus es el principal método utilizado para controlar la infección BLV en manadas. También es aconsejable agregar al rebaño únicamente animales con resultado negativo.

7.2.1 DETERMINACIÓN ACS ANTI LVB POR ELISA

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo y leche de bovinos	Determinación de anticuerpos anti virus de Leucosis Bovina Enzoótica en muestras biológicas de suero sanguíneo y leche de bovinos por el método ELISA de bloqueo.	INgezim BLV Compac 2.0 R.12.BLV.K3 Última revisión / Last revisión: 21-04-15 N° Registro en España 0808-RD

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

a. Descripción

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la leucosis enzoótica bovina en suero, basado en la utilización de anticuerpos monoclonales específicos de la gp51 del virus de la leucosis enzoótica bovina (LEB). La fase solida está constituida por placas de micro titulación sensibilizadas con gp51 capturadas mediante anticuerpos monoclonales específicos. En el primer paso, se añade la muestra de suero, si ésta contiene anticuerpos específicos de LEB estos seguirán al antígeno capturado en el pocillo. Finalmente, se añade otro monoclonal específico de LEB conjugado con peroxidasa cuya unión al antígeno quedará bloqueada. Tras lavar y añadir el sustrato cromógeno (TMB) no se observará desarrollo de color en el pocillo.
Lo contrario ocurrirá en el caso de muestras de suero negativas a LEB. No existirá bloqueo del anticuerpo monoclonal conjugado y por tanto se desarrollará color en el pocillo.

b. Precauciones

1. Leer atentamente las instrucciones de uso
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
6. No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit
10. **IMPORTANTE:** El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las condiciones externas, por lo que se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.
11. La solución de frenado es una solución fuerte, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua

c. Composición Del Kit De Elisa

REACTIVO	5 PLACAS	
	Unid.	Vol.
Placas de micro titulación de 8*12 pocillos o de 96 pocillos	5	-
Viales de Control Positivo	2	1,5ml
Viales suero Control Negativo	2	1,5ml
Viales de conjugado (100x concentrado)	1	700ul
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1	125ml
Frascos conteniendo diluyente (DE04-01) a la dilución de uso	1	125ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso	1	60ml
Frascos conteniendo solución de frenado	1	60ml

I. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-200ul
- Puntas de Micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas
- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 450nm)

II. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y 8 ºC).

d. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una Micro pipeta que permita dispensar la cantidad de 300µL por pocillo. Tras las incubaciones realizar los lavados según las siguientes instrucciones.

PASO 1. Eliminar el contenido de la placa volteándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre pocillos.

PASO 2. Distribuir unos 300µL de solución de lavado por pocillo.

PASO 3. Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

PASO 4. Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido

PASO 5. Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento

PASO 6. Antes de eliminar el contenido del ultimo lavado, Asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.

PASO 7. Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel absorbente.

e. Preparación De Los Reactivos

PASO 1. Solución de lavado 25x: Diluir una parte de lavado 25x concentrada, suministrada con kit en 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua). Una vez diluida, la solución permanece estable a 4°C.

PASO 2. Sueros controles: Se tratan como las muestras, añadiendo 50µl por pocillo. **¡ATENCIÓN!** Una vez abiertos los controles son estables 1 mes conservados entre +2ºC y+8ºC. Si se prevé su uso a más largo plazo se recomienda su congelación a -20ºC en alícuotas.

PASO 3. Preparación del conjugado: Realizar una dilución 1/100 del conjugado 100x suministrado en el kit con diluyente.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

-10µL de conjugado 100x concentrado en 1 ml de diluyente, es la cantidad necesaria y suficiente para una tira.
- 110µL de conjugado 100x concentrado en 11 ml de diluyente, es la cantidad necesaria y suficiente para una placa completa.

¡ATENCIÓN! Preparar inmediatamente antes de su utilización. Preparar únicamente la cantidad estrictamente necesaria, ya que el volumen sobrante debe ser desechado.

f. Preparación De Las Muestras

Las muestras (suero) pueden ser analizadas individualmente o en mezclas a partes iguales de hasta 10 animales.

g. Procedimiento

PASO 1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (Excepto el conjugado) a temperatura ambiente

PASO 2. Añadir 50µL de diluyente a cada pocillo. Añadir 50µL de los controles positivo y negativo (Es recomendable no poner los controles en las filas exteriores para evitar el efecto borde observado en algunas estufas) y 50µL de cada muestra a testar en cada uno de los pocillos de la placa, para conseguir una dilución 1/2 de las muestras. Es recomendable realizar el ensayo por duplicado. Agitar suavemente para la correcta mezcla de reactivos e incubar una hora a 37ºC.

PASO 3. Lavar 3 veces según procedimiento indicado.

PASO 4. Añadir 100µL de conjugado a cada pocillo, preparado según instrucciones anteriores. Incubar 30 minutos a 37ºC.

PASO 5. Lavar 4 veces según procedimiento indicado

PASO 6. Añadir 100µL de sustrato a cada pocillo. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente (20ºC- 25ºC), en oscuridad.

PASO 7. Añadir 100µL de solución de frenado con objeto de parar la reacción. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato.

PASO 8. Leer a 450nm en los 5 minutos siguientes a la adición de solución de frenado.

h. Lectura E Interpretación De Resultados

PASO 1. Validación del test: Para que este test sea válido:

- El valor de la absorbancia del control negativo ha de ser al menos 5 veces superior al valor de la absorbancia del suero control positivo:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

$$5 < \frac{Absb\ (\ Control-)}{Absb\ (\ Control+)}$$

*El valor de absorbancia del suero control negativo ha de ser mayor de 1.

PASO 2. Interpretación de los resultados

- ✓ **Cálculo de Cutt Off (Punto de corte):**
  - **CUTT OFF (-) =** CN-[(CN-CP) *0,4]
  - **CUTT OFF (+) =** CN-[(CN-CP) *0,5]

- ✓ Siendo: CN= Valor Absb del suero control (-)
  CP= Valor Absb del suero control (+)

PASO 3. Resultado del ensayo: Siendo M el valor de absorbancia de cada muestra:

- ➢ Si M ≥ CUT OFF (-)» Muestra negativa
- ➢ Si M ≤ CUT OFF (+)» Muestra positiva
- ➢ Si CUT OFF (-) > M > CUTT OFF (+)» Muestra dudosa.

En este último caso se recomienda volver a valorar el animal a las tres semanas.

EJEMPLO:

Abs (Control positivo) = 0,154
Abs (Control negativo) = 1,750
Abs (Muestra 1) = 0,170
Abs (Muestra 2) = 1,684

Validación del test:
Abs (Control-) / Abs (Control+) = 11,3 > 5
Abs (Control-) = 1,750 >1

PASO 3. Cálculos de puntos de corte

CUT OFF (-) = 1,750 – [(1,750- 0,154) *0,4] = 1,111
CUT OFF (+) = 1,750 – [(1,750- 0,154) *0,5] = 0,952

PASO 3. Resultados de las muestras:

Absb (Muestra 1) = 0,170 <Cutt Off (+) muestra 1: Positiva
Absb (Muestra 2) = 1,684 >Cutt Off (-) Muestra 2: Negativa

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

7.3 NEOSPOROSIS BOVINA

Neospora caninum es un parásito intracelular obligado de distribución mundial que afecta a cualquier tipo de ganado y a cualquier edad, aunque ha tenido mayor impacto económico en el ganado lechero. La parasitosis en el ganado se caracteriza principalmente por provocar abortos, el nacimiento de becerros clínicamente sanos, pero persistentemente infectados o el nacimiento de becerros débiles y con signos clínicos nerviosos. Los abortos pueden ser endémicos o epidémicos (tormenta de abortos), mayores al 12.5%, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas.

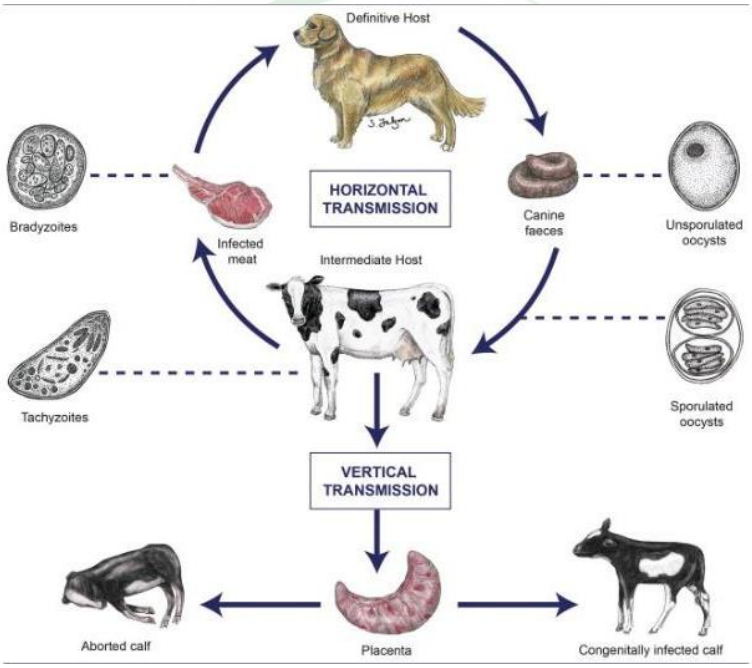
Una forma de transmisión de la parasitosis es la horizontal (transplacentaria exógena) o postnatal, la cual se presenta cuando las vacas consumen alimentos o agua contaminados con ooquistes de *Neospora caninum* que fueron excretados en las heces de perros infectados y que posteriormente esporulan siendo infectantes. Los ooquistes en el intestino, se dividen y se convierten en taquizoitos, los cuales pasan a la sangre (parasitemia) y se alojan en varios tejidos de las vacas permaneciendo latentes. La otra forma de transmisión es la vertical (transplacentaria endógena), la cual se presenta cuando una vaca previamente infectada queda gestante y las condiciones de la gestación como la producción de hormonas (progesterona) y los cambios inmunológicos favorecen la reactivación de parásitos (taquizoitos y quistes con bradizoitos) que ya estaban alojados en sus tejidos. Estas fases parasitarias una vez reactivadas, pasan nuevamente a la sangre y alcanzan a la placenta y al feto infectándolo.

7.3.1 SIGNOS CLÍNICOS Y FACTORES DE RIESGO

Cuando una vaca de cualquier edad infecta a su feto a través de su placenta, pueden suceder tres acontecimientos: uno es que la vaca aborte y éste es el único signo clínico perceptible. El aborto se presenta en cualquier periodo de la gestación, sin embargo, es más frecuente en el segundo tercio de la gestación. No necesariamente en todos los casos se presentará el aborto, sino que aproximadamente el 95% de becerros parasitados que llegan a nacer serán aparentemente saludables, pero persistentemente infectados. El mayor problema de las becerras persistentemente infectadas, es que cuando queden gestantes, los parásitos alojados en sus tejidos se reactivan y se presenta la transmisión vertical nuevamente, por lo cual también tendrán el riesgo de abortar. Por otro lado, sólo un bajo porcentaje de becerros infectados que nacen, aproximadamente el 5%, presentan signos clínicos nerviosos como miembros flexionados o hiperextendidos lo cual provocará dificultad para levantarse, desplazarse y alimentarse, apariencia asimétrica de los ojos, u ojos saltones entre otros.

En algunos estudios epidemiológicos se ha encontrado una relación entre la presencia de perros o el número de perros en los establos lecheros y la cantidad de vacas que resultan positivas a la infección por métodos de diagnóstico serológicos. Con respecto al ganado productor de carne y de doble propósito, todavía no hay evidencia de que la presencia de perros propios o ajenos que se introducen a la unidad de producción, representen un verdadero factor de riesgo, posiblemente debido a que estos bovinos consumen mayor cantidad de forraje verde y menor cantidad de alimento almacenado, disminuyendo la probabilidad del consumo de alimentos contaminados con excretas de perros o cánidos silvestres.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



7.3.2 Determinación de anticuerpos anti *Neospora caninum*

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Suero sanguíneo de bovinos	Determinación de anticuerpos anti *Neospora caninum* en muestras biológicas de suero sanguíneo de bovinos por el método ELISA Indirecta.	INgezim Neospora caninum 3.0 R.12.NC. K1 Última revisión / Last revisión: 14/07/2017 N° Registrado con N° 800 RD

a. Descripción

Este inmunoensayo enzimático (ELISA) se ha desarrollado para detectar la presencia de anticuerpos específicos de *Neospora caninum* en suero bovino. Las muestras de suero se diluyen 1/100 y se incuban durante 60 minutos en los pocillos sensibilizados con antígeno de *Neospora caninum*. Tras un primer lavado, se añade un conjugado anti-IgG bovina y se incuba 60 minutos más. Después de lavar, se añade el sustrato, el cual en caso de reacción positiva desarrollara un color azul. Tras 20 minutos la reacción se frena pasando el color de azul a amarillo y este se cuantifica en un lector de ELISA. El color en los pocillos indica la presencia de anticuerpos específicos de *Neospora caninum.* Cuánto más alta sea la concentración de anticuerpos en la muestra de suero más intenso será el color en el pocillo y por tanto mayo la densidad óptica (DO).

b. Precauciones

1. Leer atentamente las instrucciones de uso
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
6. No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit
10. **IMPORTANTE:** El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las condiciones externas, por lo que se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.
11. La solución de frenado es una solución fuerte, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua

c. Composición Del Kit De Elisa

REACTIVO	5 PLACAS	
	Unid	**Vol.**
Placas de micro titulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras tapizadas con antígeno de Neospora	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo listo para su uso	1	2,5ml
Viales conteniendo suero Control Negativo listo para su uso	1	2,5ml
Viales conteniendo Conjugado con peroxidasa listo para su uso	2	15ul
Frascos conteniendo diluyente (DE19-01)	2	60ml
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1	125ml
Frascos conteniendo sustrato a la dilución de uso	1	30ml

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Frascos conteniendo solución de frenado	1	65ml

I. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-200ul
- Puntas de Micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas
- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 405nm)

II. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y 8ºC).

d. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una Micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300µL por pocillo. Tras las incubaciones realizar los lavados según las siguientes instrucciones.

PASO 1. Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre pocillos.

PASO 2. Distribuir unos 300µL de solución de lavado por pocillo.

PASO 3. Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

PASO 4. Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido

PASO 5. Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento

PASO 6. Antes de eliminar el contenido del ultimo lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.

PASO 7. Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de absorbente.

e. Preparación De Las Muestras

Diluir las muestras de suero 1/100 utilizando el diluyente DE19-01. Se recomienda realizar esta dilución en dos pasos del siguiente modo: diluir inicialmente en una placa vacía 10µL de suero en 190µL de diluyente y a continuación transferir 10µL de esta dilución a un pocillo de la placa de ELISA que ya contenga 40µL de diluyente DE19-01.

f. Preparación De Los Reactivos

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 1. Solución de lavado: Diluir una parte de solución de lavado 25X concentrada, suministrada con el kit, con 24 partes de agua destilada (40ml de concentrado más 960ml de agua destilada).

PASO 2. Preparación de diluyente: Esta listo para uso, NO DILUIR.

PASO 3. Sueros controles: Están listos para uso. NO DILUIR,

PASO 4. Conjugado: Esta listo para uso, NO DILUIR.

g. Procedimiento

PASO 1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes a temperatura ambiente.

PASO 2. Dispensar 50µL de las diluciones de sueros a testar (preparado según instrucciones anteriores). Añadir a continuación 50µL de los controles positivo y negativo listos para usar. Recomendamos la realización de los controles por duplicado. Tapar la placa e incubar 60 minutos a 37ºC ± 1ºC.

PASO 3. Lavar tres veces con solución de lavado según el procedimiento descrito

PASO 4. Añadir 50µL del Conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar 60 minutos a 37ºC ± 1ºC.

PASO 5. Lavar cuatro veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.

PASO 6. Añadir 50µL de sustrato a cada pocillo, agitar suavemente y mantener la reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente (23ºC ± 2ºC) y en oscuridad.

PASO 7. Añadir 50µL de solución de frenado a cada pocillo en el mismo orden en el que se dispensó el sustrato.

PASO 8. Leer los valores de absorbancia a 450 nm dentro de los siguientes 5 minutos.

h. Lectura E Interpretación De Resultados

PASO 1. Cálculo del Índice de Positividad (IRPC):

Si las muestras y controles se han ensayado por duplicado, hallar la media aritmética de las dos absorbancias obtenidas.

Para calcular el índice IRPC realizar la siguiente operación:

$$IRPC = \frac{(Abs\ Muestra) - (Abs\ Control\ -)}{(Abs\ Control\ +) - (Abs\ Control\ -)} \times 100$$

PASO 2. Validación del test:
El test se considerará válido cuando:

- ✓ Abs C. Pos. – Abs C. Neg. >= 0,4
- ✓ Abs del control negativo < 0,25

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 3. Interpretación de resultados

- IRPC de la muestra ≥ 20 se considera POSITIVO.
- IRPC de la muestra < 17 se considera Negativo.
- IRPC de la muestra entre ambos valores se considera dudoso. Se recomienda recoger una segunda muestra en 2 semanas y repetir el ensayo.

7.4 RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)

La rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) es una enfermedad respiratoria aguda y contagiosa del ganado bovino causada por el herpesvirus de tipo 1 (BHV-1). Afecta fundamentalmente al aparato respiratorio y al reproductor. El herpesvirus de tipo 1 (BHV-1) pertenece a la familia *Herpesviridae*. Es sumamente contagioso y se puede extender rápidamente por un grupo de terneros. Las secreciones de los terneros afectados son extremadamente infecciosas y parecen ejercer una atracción sobre los demás animales. Puede afectar a animales de cualquier edad. Con respecto a la neumonía, suelen estar involucrados otros dos virus: el virus respiratorio sincitial bovino y el virus parainfluenza 3.

Una vez que el BHV-1 ingresa al organismo y se multiplica en el sitio de infección se desplaza a través de prolongaciones nerviosas hacia los ganglios trigémino y sacro, en donde permanece en un estado latente. Esta ubicación del virus fue demostrada usando la técnica de hibridación in situ con sondas radioactivas y, en un trabajo experimental, con la inmunofluorescencia específica. Por otra parte, otros autores informan haber aislado el BHV-1 a partir de muestras de ganglio trigémino provenientes de bovinos adultos que no presentaban signos clínicos de enfermedad. La reactivación del virus puede ocurrir o ser inducida por estímulos naturales o artificiales, como ser: parto, transporte, tratamientos inmunosupresores con corticoides, supe infección con otros virus o microorganismos, irradiación ultravioleta, tratamiento con ciclofosfamida, etc.

Una vez en el organismo el virus replica en el sitio de inoculación para luego diseminarse por medio de la sangre, el sistema nervioso o a través de puentes intercelulares y así alcanzar los órganos blanco. En el sistema nervioso periférico el virus avanza sin estar expuesto a la actividad neutralizante de los anticuerpos, igual que cuando lo hace por medio de los puentes intercelulares. Algunos autores sugieren que los virus son transportados por los leucocitos. A nivel respiratorio, el virus destruye el epitelio del tracto superior lo que, sumado a la inmunosupresión que provoca en el organismo, favorece el asentamiento de infecciones bacterianas secundarias. Entre otros factores, el BHV-1 inhibe la migración de polimorfo nucleares neutrófilos, la citotoxicidad mediada por células y la respuesta mitótica de los linfocitos sanguíneos periféricos, como así también algunas actividades funcionales del macrófago alveolar.

7.4.1 SIGNOS CLÍNICOS

BHV-1 y BHV-5 pueden originar 3 diferentes cuadros clínicos:

a) **Enfermedad respiratoria - Aborto**: La IBR es una enfermedad contagiosa y aguda de los bovinos caracterizada por fiebre (40.5-42ºC) y depresión general, descenso en la producción láctea y emaciación. La virosis afecta el tracto respiratorio superior y las lesiones patológicas suelen describirse como rinotraqueítis necrótica aguda, faringitis y laringotraqueobronquitis. Luego puede complicarse con una invasión bacteriana secundaria y derivar en una bronconeumonía.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

b) **Enfermedad genital**: Un segundo síndrome causado por BHV 1 es la IPV en las hembras o la IPB en los machos, que se caracteriza, en el primero de los casos, por una vulva edematosa e hiperémica en donde se observan pequeñas pústulas diseminadas sobre la superficie mucosa, acompañadas a veces con una descarga vaginal mucopurulenta, pues la invasión bacteriana secundaria es una secuela frecuente. La fase aguda de la enfermedad dura 2-4 días y las lesiones desaparecen 10-14 días después. En los toros, la sintomatología clínica incluye también el área genital en la forma de inflamación de pene y prepucio.
c) **Enfermedad nerviosa**: Los signos neurológicos se caracterizan por depresión, anorexia, ptialismo, amaurosis, rechinamiento de dientes, incoordinación, tremor muscular, ceguera y eventualmente muerte. Muchos de los casos tienen un diagnóstico presuntivo de poliencefalomalasia. La encefalitis usualmente ocurre sin otros signos clínicos de enfermedad por BHV-1.

7.4.2 DETERMINACIÓN ANTICUERPOS ANTI VIRUS IBR

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo de bovinos	Determinación de anticuerpos anti virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en muestras biológicas de suero sanguíneo de bovinos por el método ELISA de bloqueo.	INgezim IBR Compac R.12.IBR.K3 Última revisión / Last revisión: 01-06-18 N° Registro en España 962 RD

a. <u>Descripción</u>

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos frente a la glicoproteína gB del *virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina* en suero bovino.

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos frente al BoHV1 (*Bovine Herpes virus 1)* en ganado bovino afectado de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) o Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV) y es capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos en suero tanto de animales infectados, como de animales vacunados. La base técnica del kit es la del ensayo inmunoenzimático (ELISA) de bloqueo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación.

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) se fija el antígeno de BoHV1. Cuando las muestras de suero se depositan sobre la placa, en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un conjugado específico marcado con peroxidasa (Ac. Monoclonal de la proteína gB del virus). En el caso de que las muestras tuvieran anticuerpos frente a esta proteína, estos no permitirían la unión del conjugado, mientras que, si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el conjugado se unirá libremente al antígeno de la placa.
Tras sucesivos lavados para eliminar el material no unido, podremos revelar las reacciones acontecidas en la

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

placa mediante la adición del sustrato adecuado, el cual desarrollara una reacción colorimétrica en presencia de peroxidasa (es decir en presencia conjugado monoclonal con peroxidasa). De este modo la aparición de una reacción coloreada, indicara que la muestra ensayada no contenía anticuerpos específicos del BoHV1 y la ausencia de color indicara que la muestra es positiva y contiene dichos anticuerpos.

b. Precauciones

1. Leer atentamente las instrucciones de uso
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
6. No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit
10. **IMPORTANTE:** El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las condiciones externas, por lo que se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.
11. La solución de frenado es una solución fuerte, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.

c. Composición Del Kit

REACTIVO	5 PLACAS	
	Unid	**Vol.**
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo para BHV1	2	600ul
Viales conteniendo suero Control Negativo para BHV1	2	600ul
Viales de conjugado (AcM marcado con Peroxidasa) concentrado 100x	2	300ul
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1	125ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-01) a la dilución de uso	1	125ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso	1	60ml
Frascos conteniendo solución de frenado	1	65ml

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

I. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-200ul
- Puntas de micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas
- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 450nm)

II. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y +8ºC) Una vez abiertos, los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizaciones.

d. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una micro pipeta que permita dispensar la cantidad de 300µL por pocillo. Tras las incubaciones realizar los lavados según las siguientes instrucciones.

PASO 1. Eliminar el contenido de la placa volteándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre pocillos.

PASO 2. Distribuir unos 300µL de solución de lavado por pocillo.

PASO 3. Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

PASO 4. Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.

PASO 5. Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento

PASO 6. Antes de eliminar el contenido del ultimo lavado, Asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.

PASO 7. Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel absorbente.

e. Preparación De Las Muestras

Realizar una dilución 1/2 en diluyente. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 50µL de diluyente y luego 50µL de la muestra. Agitar suavemente para una correcta homogenización de la muestra.

f. Preparación De Los Reactivos

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 1. Solución de lavado: Diluir una parte de lavado 25x concentrada, suministrada con kit en 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua)

PASO 2. Sueros controles: Se tratan como las muestras, añadiendo 50µl por pocillo. **¡ATENCIÓN!** Una vez abiertos los controles son estables 1 mes conservados entre +2ºC y+8ºC. Si se prevé su uso a más largo plazo se recomienda su congelación a -20ºC en alícuotas.

PASO 3. Preparación del conjugado: Realizar una dilución 1/100 del conjugado 100x suministrado en el kit con diluyente.

-10µL de conjugado 100x concentrado en 1ml de diluyente, es la cantidad necesaria y suficiente para una tira.
- 110µL de conjugado 100x concentrado, en 11ml de diluyente, es la cantidad necesaria y suficiente para una placa completa.

¡ATENCIÓN! Preparar inmediatamente antes de su utilización. Preparar únicamente la cantidad estrictamente necesaria, ya que el volumen sobrante debe ser desechado.

g. <u>Procedimiento</u>

PASO 1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (Excepto el conjugado) a temperatura ambiente

PASO 2. Adición de sueros:

- Añadir 50µL de diluyente a cada uno de los pocillos que se vayan a utilizar.
- Anadir otros 50µL de suero control positivo a dos pocillos marcados y 50µL de suero control negativo a otros dos pocillos marcados. Rellenar el resto de los pocillos con 50µL de los sueros problemas a ensayar. Utilizar una punta limpia para cada muestra.

PASO 3. Tapar la placa e incubar **durante 1 hora a 37ºC**

PASO 4. Lavar cinco veces según el procedimiento descrito anteriormente.

PASO 5. Añadir 100µL del conjugado preparado según se especifica en apartado **f**, a cada pocillo. Tapar e incubar 30 min a 37ºC.

PASO 6. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.

PASO 7. Añadir a cada pocillo100µL de sustrato incubar durante **15 minutos a temperatura ambiente** en oscuridad. (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).

PASO 8. Añadir 100µL de solución de frenado a cada pocillo. ¡ATENCIÓN! La solución de frenado ha de dispensarse en el mismo orden en que se añadió la solución de sustrato.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 9. Leer los valores de absorbancia a 450 nm en los 5 minutos siguientes a la adición de la solución de frenado.

h. <u>Lectura E Interpretación De Resultados</u>

PASO 1. Validación del test: El test se considera válido cuando

- El valor de absorbancia (D0 450nm) del suero control negativo debe ser mayor a 0,750.
- Ha de cumplirse la siguiente relación:
  Control positivo/ control negativo < 0,3

PASO 2. Interpretación de los resultados: En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la media aritmética de los dos valores DO obtenidos. Igualmente se realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para control positivo y los dos pocillos para control negativo.

Para cada una de las muestras se calculará el porcentaje de bloqueo, aplicando la siguiente formula:

$$\text{PORCENTAJE DE BLOQUEO (PB)} = \frac{\text{DO control negativo – DO Muestra}}{\text{DO control negativo – DO control positivo}} \times 100\%$$

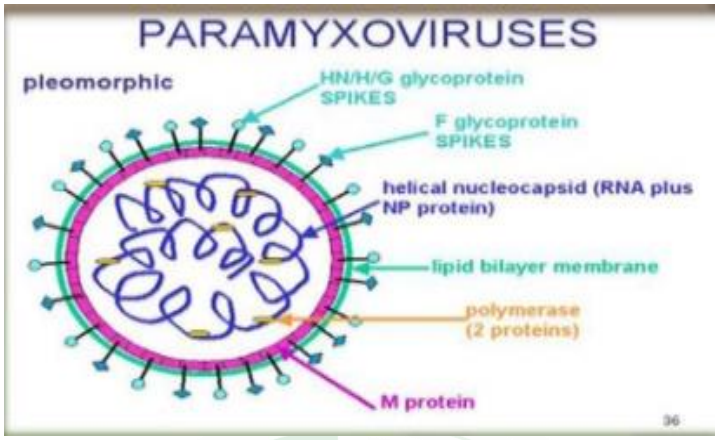
SUERO

- Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a BoHV1) cuando su porcentaje de bloqueo sea igual o superior al 30%
- Las muestras se considerarán **NEGATIVAS** (Ausencia de anticuerpos frente a BoHV1) cuando su porcentaje de bloqueo sea igual o inferior al 25%
- Las muestras que presenten porcentajes de bloqueo entre ambos valores se considerarán **DUDOSAS** y en estos casos se recomienda testar de nuevo el animal transcurridas 3 semanas.

7.5 PARAINFLUENZA 3

El virus de la Parainfluenza 3 (PI3) pertenece a la familia de los *Paramyxovirus*, agente también involucrado en la neumonía enzoótica de los terneros. Se requieren de 2 a 4 días para que un animal susceptible comience a mostrar signos clínicos. En un brote de enfermedad respiratoria aguda, es de esperar una tasa de infección del 100 %, morbilidad del 20 al 50 % y mortalidad menor al 5%.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



Esta enfermedad ocurre con mayor frecuencia en los becerros destetados y estabulados, entre las 2 semanas y 5 meses de edad. Es de alta morbilidad y puede alcanzar hasta un 30% de mortalidad en las becerras de reemplazo. La principal vía de transmisión es por medio de aerosoles y por el contacto directo entre animales enfermos y sanos por lo que esto se acentúa en condiciones de hacinamiento y mala ventilación. Los factores de riesgo ambientales son los cambios bruscos de temperatura, la humedad relativa, la calidad del aire y la alta densidad de población. El mayor riesgo de la PI3 es que puede haber una invasión secundaria por bacterias o micoplasmas. La presentación subclínica y sin complicaciones bacterianas, tiene poca importancia.

En la enfermedad respiratoria leve se presenta tos, polipnea, secreción nasal y fiebre moderada. En la forma grave los signos son disnea polipneica intensa, respiración por la boca, cabeza gacha, quejido respiratorio y puede sobrevenir la muerte. La única forma de prevenir esta afección, es mediante la vacunación. Se recomienda inmunizar a los animales a partir de las 4 semanas de nacidos y revacunar entre 3 y 5 semanas.

7.5.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI VIRUS PARAINFLUENZA 3

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo	Determinación de anticuerpos anti virus Parainfluenza 3 en muestras biológicas de suero sanguíneo, plasma y leche de bovinos por el método ELISA indirecta.	BIO-X Diagnostics. Monoscreen ELISA. Kit ELISA para serodiagnóstico del virus de la parainfluenza 3 bovina (BPI3). Ensayo indirecto para sueros sanguíneos, plasma y leche. Prueba diagnóstica para el ganado. Pozos dobles V 2.2 (23/10/2015)

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

a. Descripción

Parainfluenza 3 se aisló por primera vez en los Estados Unidos a partir del moco nasal de ganado que mostraba signos clínicos de fiebre de embarque. Su distribución en el ganado se ha encontrado en todo el mundo. La mayoría de los informes sobre la actividad del virus PI3 bovino han sido en grupos de bovinos jóvenes con enfermedades respiratorias como la neumonía enzoótica de los terneros y la fiebre del transporte.

Las infecciones por el virus PI3 bovino no se asocian invariablemente con la enfermedad, y frecuentemente ocurren infecciones subclínicas. En países europeos, la infección por BPI3 ocurre principalmente durante los meses de octubre a marzo. La infección por el virus BPI3 puede ir acompañada de infección concurrente del tracto respiratorio por otros virus como virus respiratorio sincitial, adenovirus o BVDV. En los brotes de enfermedad respiratoria bovina, no es posible diagnosticar la infección por el virus BPI3 solo por evidencias clínicas. Para establecer un diagnóstico, es necesario tomar sueros pareados de animales infectados o enviar animales del brote para necropsia para facilitar los análisis inmunocitoquímicos de las vías respiratorias inferiores. La infección por el virus BPI3 en un brote de enfermedad respiratoria puede ser detectada por la demostración de un aumento en el título de anticuerpos séricos al virus entre la fase aguda y convaleciente (seroconversión).

a) principio De La Prueba

La prueba utiliza placas de microtitulación de 96 pocillos sensibilizadas por el virus BPI3 purificado. Las columnas impares de la placa (1, 3, 5, 7, 9 y 11) contienen el virus, mientras que las columnas pares (2, 4, 6, 8, 10 y 12) contienen un antígeno de control. Los sueros de sangre de ensayo y el plasma se diluyen en el tampón de dilución. Las muestras de leche se utilizan sin diluir. La muestra se añade a la placa que se incuba y se lava. El conjugado, proteína G marcada con peroxidasa, se añade a los pocillos. La placa se incuba una segunda vez a 21ºC +/- 3ºC. Después de la segunda incubación, la placa se lava de nuevo y se añade el cromógeno (tetrametilbencidina). Este cromógeno tiene la ventaja de ser más sensible que los otros cromógenos peroxidasa y no cancerígenos. Si las inmunoglobulinas específicas PI3 están presentes en la muestra de suero o leche, el conjugado permanece unido al micropocillo que contiene el antígeno viral y la enzima cataliza la transformación del cromógeno incoloro en un pigmento compuesto. La intensidad del color azul resultante es proporcional al título de anticuerpo específico de la muestra. La lectura del de control negativo se resta de la del control positivo sensibilizada por el antígeno viral. Es posible cuantificar la reactividad de una muestra desconocida en una escala que varía de 0 a +++++.

b. Composición Del KIT

- Microplacas: Dos placas de microtitulación de 96 pocillos (12 tiras de 16 pocillos). Las columnas impares (1, 3, 5, 7, 9 y 11) son sensibilizados por el antígeno viral PI3 y las columnas pares (2, 4, 6, 8, 10 y 12) por el control.
- Solución de lavado: Una botella de 100 ml de solución de lavado concentrada 20x. La solución cristaliza espontáneamente cuando está frío. Si sólo se va a utilizar una parte de la solución, llevar la botella a 21 ° C +/- 3 ° C hasta que todos los cristales han desaparecido. Mezclar bien la solución y eliminar el volumen necesario. Diluir el tampón 1:20 con agua destilada o desmineralizada.
- Tampón de dilución: Una botella de 30 ml de tampón coloreado y concentrado 5x para diluir el suero sanguíneo, el plasma y el conjugado. El contenido de la botella debe diluirse con agua destilada o

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

desmineralizada. Si un depósito en la parte inferior del receptáculo, filtrar la solución en papel de filtro Whatman.

- Conjugado: 1 botella de Proteína G marcada con peroxidasa de rábano picante.
- Referencia positiva: Una botella de suero positivo. Guarde este reactivo entre + 2 ° C y + 8 ° C.
- Referencia negativa: Una botella de suero negativo. Guarde este reactivo entre + 2 ° C y + 8 ° C.
- Trazador: Una botella de trazador. Reconstituir este reactivo con 0,5 ml de agua destilada o desmineralizada. Una vez reconstituido, el reactivo se almacena a -20 ° C. Divida este reactivo en varias porciones antes de congelarlo. Evitar ciclos repetidos de congelación / descongelación. Si se toman estas precauciones, el reactivo puede mantenerse durante varios meses. El trazador es una muestra de referencia que se puede utilizar para comprobar la reproducibilidad intra-laboratorio de kits del mismo lote.
- Reproducibilidad intra-laboratorio: Grado de concordancia entre los resultados de pruebas repetidas en la misma muestra con un protocolo técnico idéntico en un laboratorio dado bajo condiciones de trabajo variables.
- Un componente único TMB: Una botella de 25 ml del cromógeno Tetrametilbencidina (TMB). Almacene entre + 2 ° C y + 8 ° C protegido de la luz. Esta solución está lista para usar.
- Solución de parada: Una botella de 15 ml de la pho 1 M

REACTIVO	BIO K 239/2
Microplacas	2
Solución de lavado	1 x 100 ml (20 X)
Tampón de dilución coloreado	1 x 30 ml (5 x)
Conjugado	1 x 0,5 ml (50 x)
Suero positivo	1 x 0,5 ml (1 x)
Suero negativo	1 x 0,5 ml (1 x)
Trazador	1 x 0,5 ml (liofilizado)
TMB componente único	1 x 25 ml (1 x)
Solución de parada	1 x 15 ml (1 x)

c. Material Y Material Adicional Requerido

- Agua desionizada.
- Probetas.
- Vasos de precipitado.
- Tubos de plástico.
- Gradillas para tubos.
- Microplacas para dilución.
- Dispensadores.
- Depósito de reactivos para pipetas multicanal.
- Adhesivo para microplacas, (mono canales y multicanal).
- Lector de microplacas.
- Lavador de microplacas (opcional).

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Agitador de microplacas (opcional)

d. <u>Procedimiento</u>

PASO 1. Atemperar todos los componentes a 21 ° C +/- 3 ° C antes de su uso. Retire la microplaca de su envoltura.

PASO 2. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS 2.1- Sueros sanguíneos y preparación de plasma Las muestras de suero y plasma sanguíneo deben diluirse 1: 100. Evite el uso de muestras hemolizadas o las que contengan coágulo.

- ✓ Dilución en tubos: Distribuir alícuotas de 990 µl de tampón de dilución, preparadas como se indica en la sección "Composición del kit", a tubos de 5 ó 10 ml. Añadir alícuotas de 10 µl de las muestras a cada uno de estos tubos y mezclar brevemente en un agitador mecánico (dilución final: 1: 100).
- ✓ Dilución en microplaca Distribuir alícuotas de 20 µl de cada una de las muestras en los micropocillos de una placa de dilución. Añadir 180 µl de tampón de dilución. Mezclar cinco veces por bombeo y agitación o agitación orbital (dilución: 1:10). Distribuir alícuotas de 90 µl de tampón de dilución a los pocillos de la microplaca del kit. Transferir 10 µl de las muestras 1:10 pre diluidas. Mezclar cinco veces por pipeteo y agitación o agitación orbital (dilución final: 1: 100).

PASO 3. Dilución de los sueros de referencia del kit (controles positivo y negativo) y trazador. Los sueros positivos y negativos y el trazador deben diluirse 1: 100. Hacer estas diluciones en un solo paso en un tubo (véase el PASO 2 Dilución en tubos) o en dos pasos en una microplaca de dilución (véase el PASO 2 Dilución en microplaca).

PASO 4. Preparación de la leche. Centrifugar a 4000 g durante 20 minutos. Tomar la capa media de líquido por medio de una pipeta Pasteur de vidrio introducida a través de la capa superior de crema, teniendo cuidado de no tocar el sedimento celular subyacente. Utilice muestras de leche desnatada sin diluir en los pozos.

PASO 5. Distribuya las muestras (suero sanguíneo, plasma o leche) en cantidad 100 µl por pocillo. Por ejemplo, se puede seguir el siguiente patrón: Suero positivo en los pocillos A1 y A2, suero negativo en los pocillos B1 y B2, trazador en los pocillos C1 y C2, Muestra 1 en los pocillos D1 y D2, y así sucesivamente. Cubrir con una tapa e incubar la placa en 21 ° ± 3 ° C durante una hora.

PASO 6. Enjuagar la placa con la solución de lavado preparada como se indica en la sección "Composición del kit". Al eliminar el contenido de la microplaca volteándola bruscamente sobre un recipiente lleno de un agente inactivante. Seque la microplaca invirtiéndola sobre una hoja de papel absorbente limpio para eliminar todo el líquido. Añadir 300 µl de la solución de lavado, y luego vaciar la placa una vez más volteándola por encima del recipiente de contención. Repita la operación completa dos veces más, teniendo especial cuidado para evitar burbujas formación en los pozos. Después de estos tres enjuagues, continúe con el siguiente paso. También se recomienda usar una lavadora de placas (automática o manual). Sin embargo, la profundidad de la inmersión de las agujas debe fijarse de modo que no perturbe la capa de reactivos adsorbida al fondo de cada pocillo.
También puede utilizarse un lavador automático de placas, pero en este caso debe evitarse el contacto entre las agujas y el fondo de los pocillos que pueda originar cualquier daño de la capa reactiva.

PASO 7. Diluir el conjugado 1:50 en el tampón de dilución (por ejemplo, para una placa diluir 250 µl del conjugado en 12,250 ml de diluyente). Añadir 100 µl de la solución de conjugado diluido a cada pocillo. Cubrir con un tapar e incubar la placa a 21 ° ± 3 ° C durante una hora.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 8. Lave la placa como se describe en el paso 6.

PASO 9. Añadir 100 µl de la solución de cromógeno a cada pocillo de la placa. La solución de cromógeno debe ser absolutamente incolora cuando se pipetea en los pocillos. Si un color azul es visible, esto significa que la solución se ha contaminado.

PASO 10. Incubar durante 10 minutos a 21 ° C +/- 3 ° C protegido de la luz y descubierto. Este tiempo se da como solo como una guía ya que en algunas circunstancias puede ser útil alargar o acortar el tiempo de incubación.

PASO 11. Añadir 50 µl de solución de parada por micropocillo. El color azul cambiará a un color amarillo.

PASO 12. Leer las densidades ópticas en los micropocillos usando un lector de placas y un filtro de 450 nm. Los resultados deben leerse bastante pronto después de que se ha añadido la solución de parada ya que el cromógeno puede cristalizar en pocillos con señales fuertes y distorsionar así los datos.

e. Interpretación De Resultados

Reste de cada lectura obtenida en las columnas impares la lectura del pozo control negativo correspondiente y registre el resultado (Delta). Al realizar este cálculo, tenga en cuenta que pueden existir valores negativos. Llevar a cabo la misma operación para la columna correspondiente a los controles positivo y negativo. La prueba puede ser validada sólo si el suero positivo produce una diferencia en la densidad óptica a los 10 minutos que es superior a 0,800 y el suero negativo produce una diferencia de densidad óptica inferior a 0,300 Divida la lectura de cada muestra entre la lectura del suero de control positivo y multiplique este resultado por 100 para expresarlo como un porcentaje.

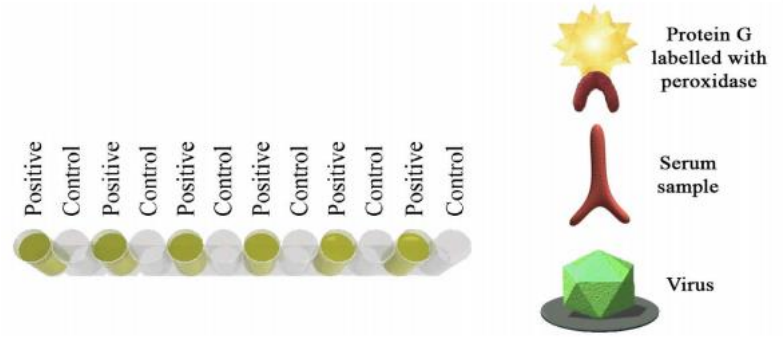
$$\text{VALOR (PP)}: \frac{\text{Delta OD Muestra} * 100}{\text{Delta OD positivo}}$$

Utilizando la siguiente tabla, determine el grado de positividad de cada suero.

0		+		++		+++		++++		+++++
Val <=	20 %	< Val <=	40 %	< Val <=	60 %	< Val <=	80 %	< Val <=	100 %	< Val

Un diagnóstico fiable sólo puede hacerse si la seroconversión franca puede documentarse utilizando dos muestras de suero tomadas a intervalos de 2 a 3 semanas. La primera muestra debe tomarse durante la fase aguda de la infección. Se considera que una seroconversión franca se ha producido si la señal aumenta en dos órdenes de magnitud (dos más, por ejemplo, ++ -> ++++ o + -> +++). Una muestra debe ser considerada positiva si produce un resultado que es mayor o igual que (+).

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



7.6 *MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS*

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo y leche de bovinos, ovinos o caprinos	Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos específicos de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* por el método ELISA indirecta.	*Mycobacterium paratuberculosis* Test Kit PARACHEK® 2. Ensayo indirecto para sueros sanguíneos y leche. Prueba diagnóstica para el ganado.

La enfermedad de Johnes o Paratuberculosis es una enteritis crónica de los rumiantes causada por la infección de *Mycobacterium paratuberculosis*. Durante la fase activa de la infección y antes de aparecer sintomatología clínica, los animales generalmente desarrollan anticuerpos específicos de *M. paratuberculosis*. Los animales no infectados carecen de este tipo de anticuerpos, pero pueden tener reacciones cruzadas con otras *Mycobacterias*. Este ensayo muestra alto rendimiento, detectando anticuerpos específicos de *M. paratuberculosis* en suero, plasma y leche y puede ser utilizado como test específico de la enfermedad de Johnes en ganado vacuno. Este test ha sido evaluado con animales procedentes de zonas endémicas afectadas por Paratuberculosis y de zonas libres en Australia y Estados Unidos. La especificidad del test fue del 99% o mayor para ganado bovino, ovino y caprino. Los cálculos de sensibilidad en vacas se ven afectados por la historia de granja en estudio. No obstante, el ELISA es capaz de detectar hasta un 80% de animales antes de la aparición de síntomas clínicos y entre el 60-65% de secretores fueron positivos en o antes de la primera detección en cultivo de heces en ovejas, la sensibilidad estimada del test es del 38- 44%4 y para cabras del 65-88%. El test permite estudios epidemiológicos y es una herramienta útil en el manejo y control de la enfermedad de Johnes en ganado bovino, ovino y caprino.

a. Principio del ensayo

El test consiste en cuatro pasos:

Paso 1 Las muestras de suero o leche son diluidas e incubadas en diluyente verde conteniendo M. phlei para

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

eliminar los anticuerpos que puedan dar lugar a reacción cruzada.

Paso 2 Las muestras diluidas se añaden a la placa recubierta con antígeno de M. paratuberculosis. Los anticuerpos no específicos se eliminan mediante un paso de lavado después de la incubación.

Paso 3 El conjugado (IgG anti bovina marcada con peroxidasa) reacciona con las inmunoglobulinas unidas al antígeno y el sobrante se elimina mediante lavado después de la incubación

Paso 4 Adición de substrato. La velocidad de conversión del substrato es proporcional a la cantidad de inmunoglobulina presente. La reacción se para con solución de parada y el desarrollo de color se mide fotométricamente

b. Componentes del kit

Conservar el kit a 5±3°C hasta su fecha de caducidad. Ver etiqueta para fecha de caducidad. La caducidad de los reactivos diluidos, abiertos, o reconstituidos se indicará cuando sea necesario. Los datos de seguridad de los reactivos, están disponibles en la sección correspondiente.

Referencias de producto
Kit de dos (2) placas: 63327
Kit de cinco (5) placas: 63325
Kit de treinta (30) placas: 63328

Componente 1 Placas con el antígeno (M. paratuberculosis).
63327: 2 x 96 pocillos con tapas
63325: 5 x 96 pocillos con tapas
63328: 30 x 96 pocillos con tapas Listas para usar.

Componente 2 Control Positivo
63327: 1 x 0.75 ml
63325: 1 x 1.0 ml
63328: 1 x 2.0 ml
Contiene 0.01% p/v thimerosal. Listo para usar.

Componente 3 Control Negativo
63327: 1 x 0.75 ml
63325: 1 x 1.0 ml
63328: 1 x 2.0 ml
Contiene 0.01% p/v thimerosal. Listo para usar.

Componente 4 Diluyente verde: Tampón de dilución de muestras Contiene 0.01% p/v thimerosal.
63327: 1 x 100 ml
63325: 1 x 250 ml
63328: 3 x 500 ml Listo para usar.

Componente 5 Solución de Lavado – 20x Concentrada
63327: 1 x 100 ml

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

63325: 1 x 250 ml
63328: 2 x 500 ml Contiene 0.01% p/v thimerosal. Diluir con agua destilada

Componente 6 Conjugado – 100x Concentrado (Ig anti-bovina marcada con Peroxidasa.)
63327: 1 x 0.5 ml
63325: 1 x 0.75 ml
63328: 2 x 2.0 ml Contiene 0.01% p/v thimerosal. Diluir con diluyente azul.

Componente 7 Diluyente azul: Tampón de dilución de conjugado
63327: 1 x 30 ml
63325: 1 x 75 ml
63328: 2 x 200 ml Contiene 0.01% p/v thimerosal. Listo para usar.

Componente 8 Substrato
63327: 1 x 30 ml
63325: 1 x 75 ml
63328: 2 x 200 ml Contiene solventes orgánicos. Listo para usar.

Componente 9 Solución de Parada
63327: 1 x 15 ml
63325: 1 x 50 ml
63328: 1 x 200 ml (0.5M H_2SO_4) Listo para usar.

c. Precauciones generales

1. Seguridad en Laboratorio Deben seguirse en todo momento los procedimientos de seguridad establecidos.
2. Solución de Parada Es un ácido fuerte. Despeje el área derramada inmediatamente y lávela con abundante agua. Si la solución de frenado entra en contacto con la piel o los ojos, aplique abundantes cantidades de agua y solicite atención médica.

d. Equipamiento Necesario

• Pipetas de precisión de volumen variable (475 µl, 25 µl y 10 a 120 µl)
• Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
• Probetas o vasos de 100 ml, 1 litro y 2 litros
• Lavador/dispensador apropiado
• Agitador de placas
• Pipeta multicanal (volúmenes de 50 y 100 µl)
• Lector de placas. Este lector DEBE ser ajustado con filtros de 450 nm y 620-650 nm.
• Placa vacía utilizada para diluciones de la muestra (ej. Placa transparente de 96 pocillos con fondo en U) o equivalente no tapizada.

e. Preparación de reactivos

1. Placas con el antígeno (M. paratuberculosis). Dejar que se equilibren a temperatura ambiente (22±3°C) durante al menos 30 minutos antes de abrir la bolsa de plástico.
2. Controles Positivo y Negativo Llevar a temperatura ambiente (22±3°C) y agitar bien para homogenizar la

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

solución.
3. Diluyente verde Tampón de dilución de muestras. Llevar a temperatura ambiente (22±3°C) y agitar bien antes de usar. (Listo para usar).
NOTA: Se requieren más de dos horas para que la botella de este reactivo llegue a temperatura ambiente. Si no hay tiempo suficiente para atemperar, se debe utilizar un baño de temperatura ambiente.
4. Diluyente azul Tampón de dilución de conjugado. Llevar a temperatura ambiente (22±3°C) y agitar bien antes de usar. (Listo para usar).
5. Conjugado 100x Concentrado El conjugado 100x Concentrado DEBE conservarse a 5±3°C siempre.
6. Preparación del conjugado Llevar el diluyente azul a temperatura ambiente (22±3°C) y agitarlo bien. Realizar una dilución 1/100 del conjugado 100x suministrado en el kit con el diluyente azul previamente atemperado para obtener la dilución lista para usar, (Ver tabla de preparación de conjugado). Almacenar el conjugado 100x a 5±3°C inmediatamente después de su uso.
7. Solución de Lavado – 20x Concentrada Mezclar una parte de la solución de lavado concentrada 20x con 19 partes de agua desionizada. La solución de lavado resultante puede almacenarse a temperatura ambiente (22±3°C) durante 2 semanas.
8. Substrato Llevar a temperatura ambiente (22±3°C) durante 30 minutos antes de utilizar. Listo para usar. El sustrato debe ser transparente y claro. Descartar si aparece coloración azul o cualquier evidencia de precipitación. Depositar el volumen requerido en un tubo para su uso. No pipetear de la botella y no devolver el resto de lo utilizado.
NO UTILICE CONTENEDORES O PIPETAS DE POLIESTRIENO.
Cualquier recipiente usado para los reactivos del sustrato debe lavarse sucesivamente con SO4H2 1N ó HCl y al menos tres veces con agua destilada para asegurarse de que no queda ningún resto del ácido. Proteger el reactivo de la luz y de la evaporación.

TABLA DE PREPARACIÓN DE CONJUGADO (TABLA 1)

Número de tiras	Volumen de concentrado	Volumen de diluyente
1	10 µl	1 ml
2	20 µl	2 ml
3	30 µl	3 ml
4	40 µl	4 ml
5	50 µl	5 ml
6	60 µl	6 ml
7	70 µl	7 ml
8	80 µl	8 ml
9	90 µl	9 ml
10	100 µl	10 ml
11	110 µl	11 ml
12	120 µl	12 ml

f. Notas del Procedimiento

1. Atemperar (22±3°C) todos los reactivos excepto el conjugado 100x durante al menos 30 minutos antes de usar. NOTA: Ver requerimientos especiales para el Diluyente Verde.
2. Todos los componentes del kit deben conservarse a 5±3°C. Volver a almacenar a 5±3°C inmediatamente después de usar. La solución de lavado puede almacenarse a temperatura ambiente durante 2 semanas. 3. El conjugado 100x concentrado debe conservarse a 5±3°C siempre.
4. Utilizar una punta desechable diferente para cada muestra para evitar contaminaciones.
5. Las muestras deben ensayarse por duplicado en pocillos adyacentes.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

6. El ensayo ha sido validado para muestras de suero, plasma y leche fresca, congelada o entera. No utilizar calostro o leche de la primera semana. Las leches se analizan a dilución 1/2; los sueros y los controles se utilizan a dilución 1/20.
7. Los controles positivo y negativo deberán ser analizados por duplicado. Se recomienda situarlos al principio de la placa (Ej. en los pocillos A1/B1 los controles positivos y en C1/D1, los controles negativos.

g. Procedimiento del ensayo

1. Atemperar todos los componentes del kit (excepto el conjugado).
2. Diluir las muestras de suero 1/20 y de leche ½ en diluyente verde en una placa de trabajo. Ej. 15 µl de suero o controles en 285 µl de diluyente verde si el ensayo es por duplicado o 10 µl de muestra más 190 µl de diluyente verde si el ensayo es individual, o 150 µl de leche en 150 µl de diluyente verde si el ensayo es por duplicado. Mezclar bien ya sea con pipeta o con agitador de placas al menos un minuto a velocidad moderada. La reacción entre la muestra y el diluyente verde puede mantenerse desde 1 min. hasta 24 horas.
3. Transferir 100 µl de las muestras test y de los controles de la placa de trabajo a los pocillos correspondientes de la placa test tapizada con M. paratuberculosis.
4. Cubrir e incubar 30±3 minutos a temperatura ambiente (22±3°C). El conjugado 100x concentrado deberá diluirse a la dilución de uso una vez terminado el paso de lavado. En caso de realización del ensayo de forma automatizada, el conjugado puede ser utilizado hasta 8 horas a temperatura ambiente después de haber sido preparado (22±3°C).
5. Vaciar los pocillos y lavar 3 veces con 300 µl solución de lavado. Se recomienda utilizar un lavador automático de placas con un programa apropiado de lavado. En caso de lavado a mano, se recomienda tener precaución de no contaminar los pocillos adyacentes. Sacudir los pocillos suficientemente para eliminar la solución de lavado después de cada ciclo de lavado. Después del último ciclo de lavado. Situar las placas bocabajo sobre un papel de filtro limpio material similar para eliminar la solución de lavado de los pocillos.
6. Añadir 100 µl del conjugado recién diluido (ver tabla 1), a cada pocillo y agitar la placa.
7. Tapar las placas e incubar a temperatura ambiente (22±3°C) durante 30±3 minutos.
8. Lavar según procedimiento descrito en el paso 5.
9. Añadir 100 µl de la solución de sustrato recién preparada en cada pocillo.
10. Tapar las placas, agitarlas e incubar a temperatura ambiente (22±3°C) durante 15-20 min.
11. Añadir 50 µl de la solución de frenado a cada pocillo. Luego mezclar agitando cuidadosamente.
NOTA: La solución de frenado debe añadirse a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad que la solución del sustrato.
12. Leer a 450 nm, y utilizar 620 nm como longitud de onda de referencia en los 30 min. siguientes a haber parado la reacción. Los valores de absorbancia serán utilizados para el cálculo de resulta- dos.

h. Criterios de validación del ensayo

Los resultados obtenidos por los controles deben ser analizados antes de interpretar los resultados de las muestras. Determinar la media de absorbancias de los controles positivo y negativo.
El ensayo se considerará válido cuando:
- El valor medio de DO corregida del control positivo (CP) sea mayor o igual que 0,500 ODCP≥0,500
- La relación del valor medio de DO corregida del control positivo (CP) respecto al valor corregido del negativo (CN) debe ser mayor o igual que 5 ODCP/ODCN≥ 5

Deberán cumplirse ambos criterios para que el ensayo sea válido. Si no, el ensayo deberá repetirse.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

I. Cálculo de resultado de la muestra

% Positividad (PP) de la muestra = (DO muestra-DOCN) /DOCP-DOCN) *100
DOCP= media de los valores del Control Positivo
DOCN = media de los valores del Control Negativo
El porcentaje de positividad (%P, PP) del Control positivo se considera el 100%.

J. Interpretación de resultados

• Una muestra bovina u ovina es POSITIVA si su valor de Porcentaje de Positividad es SUPERIOR o IGUAL al valor del Cutt off de 15% Porcentaje de Positividad (%P). Para muestras de leche, bovina se considerarán positivas si el %P es mayor o igual del 10%. Un resultado positivo indica que el animal puede estar infectado con M. paratuberculosis y que existen animales potencialmente infectados en el rebaño.

• Una muestra bovina u ovina es NEGATIVA si su valor de Porcentaje de Positividad es MENOR que el valor del cut off de 15% Porcentaje de Positividad (%P). Para muestras de leche bovina, se considerarán negativas si su valor de %P es menor del 10%. Un resultado negativo de un único animal sólo puede interpretarse cuando se conocen el histórico y los resultados de todo el rebaño. Aunque, generalmente los animales se infectan al nacer, puede que la respuesta inmunológica no se produzca inmediatamente. La información disponible sugiere que la seroconversión se produce antes de la aparición de signos clínicos. Como todas las pruebas biológicas, este ensayo puede ocasionalmente dar falsos positivos o falsos negativos debido a condiciones locales. Un ensayo debe interpretarse en el contexto de todos los datos clínicos disponibles, un histórico y una información epidemiológica relevantes para los animales de la prueba. En algunos casos, se precisarán nuevas pruebas de confirmación.
La responsabilidad para la interpretación de los resultados y las consiguientes decisiones con respecto a la explotación estudiada reside únicamente en el utilizador, en los controles veterinarios y en los asesores de las autoridades competentes. PRIONICS AG no acepta ninguna responsabilidad sobre cualquier pérdida o daño derivado de la interpretación de los resultados.

K. Información técnica

Seguir las instrucciones de PARACHEK® 2 Johne's Absorbed EIA rigurosamente ya que cualquier variación en el protocolo puede afectar al funcionamiento del test y dar resultados erróneos.

1. Mezclar el conjugado y el diluyente azul en el vortex. Los resultados se pueden afectar si se hace demasiado fuerte. El vortex deberá utilizarse a velocidad moderada, empezando y parando 3-4 veces para evitar o minimizar la formación de espuma del diluyente. Esta precaución debería tomarse siempre que se mezclen reactivos biológicos. No obstante, la mezcla insuficiente puede dar también problemas. Recordar que la mezcla no sufrirá daños siempre y cuando se agite suavemente. Para que el ensayo sea repetitivo y exacto, asegurarse de que el conjugado está perfectamente mezclado.

2. Las instrucciones del kit indican que la placa debe agitarse después de añadir los reactivos. El hecho de no agitar podría afectar a la reproducibilidad de ensayo y dar resultados inválidos. Después de añadir cada reactivo, la placa debe agitarse en un agitador de placas durante 1 min. También deberá agitarse de la misma forma antes de leer la absorbancia.

3. Hacer un blanco en los lectores de EIA puede ser problemático ya que cada lector realiza esta operación de

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

forma diferente respecto al control negativo. Hacer el blanco con una placa vacía y limpia.

L. Notas Generales

Nota informativa: Este manual se considera completo y correcto en el momento de su publicación. Prionics AG no asume ninguna responsabilidad por daños fortuitos o consiguientes en relación con o tras el uso de este manual.

Responsabilidad: Prionics AG garantiza que sus productos cumplen las correspondientes especificaciones publicadas, siempre que se usen de acuerdo con las instrucciones correspondientes que sean del caso y dentro de la fecha de caducidad de los productos. Prionics AG no da ninguna otra garantía, explícita o implícita. No hay ninguna garantía de comercialidad o idoneidad para un uso particular. La garantía aquí ofrecida y los datos, especificaciones y descripciones de los productos Prionics AG que aparecen en catálogos de Prionics AG impresos y en la bibliografía sobre los productos no pueden ser modificados salvo tras acuerdo escrito explícito firmado por un representante autorizado de Prionics AG. Cualquier representación oral o escrita en contradicción con esta garantía o con dichas publicaciones no está autorizada y, si ha sido dada no es de fiar. En caso de incumplimiento de la garantía susodicha, la única obligación de Prionics AG consistirá, a su elección, en reparar o remplazar el producto en cuestión o parte del mismo, siempre que el cliente notifique el incumplimiento a Prionics AG sin demora. Si, tras esfuerzos razonables, Prionics AG resulta incapaz de reparar o restituir el producto o parte del mismo, entonces Prionics AG restituirá al cliente todos los efectivos pagados por el producto o la parte en cuestión. Prionics AG no asume ninguna responsabilidad por daños indirectos fortuitos, consiguientes, especiales o de cualquier otro tipo que resulten de pérdidas económicas o daños a la propiedad sufridos por cualquier cliente como consecuencia del uso de sus productos.

7.7 BRUCELLA ABORTUS

Brucelosis, enfermedad causada por la bacteria intracelular facultativa Brucella abortus, es una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial que afecta principalmente al ganado bovino, causando esterilidad en machos y abortos en hembras en gestación. La resistencia depende del desarrollo de una inmunidad mediada por células, con la participación de células T CD4+ de tipo Th1, que secreten interferón gama (-INF), citosina que estimula la actividad bactericida por macrófagos y la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+, que son capaces de matar células infectadas con Brucella. Brucella posee como componentes antigénicos importantes el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas, entre las que se destaca por su demostrada capacidad inmune la superóxido dismutasa (SOD). La prevención de la diseminación de la brucelosis se fundamenta en el desarrollo de vacunas eficientes contra B. abortus, utilizándose cepas atenuadas de Brucella abortus como la cepa 19, cepa 45/20 y la cepa RB51; vacunas subcelulares en base a antígenos que forman parte de la estructura de la bacteria y vacunas basadas en moléculas de ácidos nucleicos, como las vacunas ADN y las vacunas ARN. En la presente revisión se pretende dar una visión actualizada sobre la brucelosis, su patogenia y cuadro clínico. Se hace un análisis de las características genéticas, antigénicas e inmunológicas de Brucella. Luego, una exposición de las vacunas actualmente en uso para su prevención y los estudios con vacunas subcelulares para finalizar con las nuevas tendencias en la generación de vacunas, como las vacunas ADN y ARN para Brucella.
La brucelosis es una zoonosis cuya incidencia y prevalencia varían de un país a otro. La infección causada por la especie *Brucella abortus* es la que más frecuentemente afecta al ganado bovino, causando esterilidad en machos y abortos en hembras preñadas, lo que conduce a graves pérdidas económicas en países en los que es endémica. En países no desarrollados constituye además un problema sanitario para la población humana.
B. abortus es una bacteria Gram negativa con un lipopolisacárido (LPS) fuertemente inmunodominante, el que junto con la capacidad de sobrevivir en el interior de células fagocíticas constituyen sus principales factores de

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

virulencia. La infección en humanos conduce a una enfermedad con tendencia a la cronicidad, con fiebre y malestar recurrentes que deterioran su calidad de vida y que además puede presentar complicaciones como artritis, meningitis, entre otras.

En el ganado bovino la bacteria se ubica en la placenta y órganos reproductores por su afinidad por el eritritol. La respuesta inmune frente a *B. abortus*, patógeno intracelular facultativo, depende principalmente de la activación de la inmunidad mediada por células, con la participación de células T $CD4^+$ de tipo Th1, que secretan interferón gama (INF-γ), citoquina que estimula tanto la actividad bactericida de macrófagos como la actividad citotóxica de los linfocitos T $CD8^+$. Estos últimos son capaces entonces de destruir células infectadas con *Brucella*.
La identificación de proteínas con demostrada capacidad inmune, entre las que se ha identificado la superóxido dismutasa Cu/Zn de *B. abortus* (SOD), ha permitido diseñar estrategias de vacunación basadas en componentes subcelulares, ya que la prevención de la diseminación de la brucelosis, basada en la vacunación con bacterias atenuadas de *Brucella abortus* cepa 19, cepa RB51 y cepa 45/20, no ofrece garantías de seguridad en su administración, ni tampoco permite la completa erradicación del microorganismo patógeno. En la actualidad las nuevas tendencias en investigación acerca de vacunas se están desarrollando en base a moléculas de ácidos nucleicos, como las vacunas ADN y las vacunas ARN.

7.7.1. DISTRIBUCION GEOGRAFICA. La brucelosis tiene una distribución geográfica limitada, siendo un problema importante en el Mediterráneo, el oeste de Asia y algunas zonas de Africa y Latinoamérica, especialmente en países con bajos recursos económicos (Corbel 1997, Moreno y Moriyón 2002). En el centro y norte de Europa y en Australia la infección por *B. abortus* ha sido prácticamente erradicada. En Norteamérica, la brucelosis es especialmente prevalente en las zonas agrícolas del norte y centro de México (Gándara y col 2001), mientras que en Canadá y Estados Unidos ha disminuido considerablemente en los últimos años. *B. abortus* está presente en todos los países de América Central, siendo la prevalencia de un 4 a un 8% (Moreno 2002). En Sudamérica se encuentra en varios países, donde en muchos casos es endémica y un problema sanitario importante (Corbel 1997, Lucero y col 1999, Rodríguez y col 2001). En Chile, la Décima Región de Los Lagos es la que comprende la mayor área productora de leche y, además, tiene la mayor concentración de ganado infectado (Ramírez y Sigal 2002, Rivera y col 2002).

7.7.2. PATOGENIA. La mayoría de los animales se infectan directamente a través de la mucosa oronasal, por ingestión de alimentos contaminados o por inhalación de polvo de los establos con microorganismos que los animales han secretado con la leche o los exudados vaginales después del aborto (Rodríguez y col 2001). *B. abortus*, además de infectar al ganado bovino, puede infectar a otras especies como búfalos, bisontes, alces, jabalíes, zorros, renos, camellos y animales marinos (Mandell 1995, Cloeckaert y col 2000). Inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, las bacterias son transportadas, libres o en el interior de células fagocíticas, hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada. Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en el interior de las células fagocíticas (Ilarmon y col 1988). Los ganglios linfáticos responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses (Rodríguez y col 2001). En los fagosomas de los macrófagos, *Brucella* sobrevive y se multiplica, inhibiendo la fusión del fagosoma que contiene la bacteria y el lisosoma, mediante la acidificación rápida del medio (Pizarro-Cerda y col 1998, Celli y col 2003, Ko y Splitter 2003). En células fagocíticas no profesionales, la internalización de *B. abortus* se asocia al dominio extracelular de la proteína tirosina quinasa y la activación de una serie de pequeñas GTPasas (Guzmán- Berri y col 2001), tendiendo a localizarse dentro del retículo endoplásmico rugoso (Corbel 1997). En infecciones experimentales, en ratones, se ha observado que la infección tiene dos fases: durante las primeras dos semanas la bacteria se multiplica rápidamente; en la segunda fase, el número de bacterias se estabiliza hacia la quinta o sexta semana y luego decrece lentamente hasta desaparecer (Hong y col 2000). La especial

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

afinidad que estas bacterias tienen por el endometrio grávido y por la placenta fetal de bovinos hace que estas bacterias también proliferen extensamente en trofoblastos de la placenta que rodean al feto (Meador y Deyoe 1989), lo que condiciona que la principal manifestación clínica de la infección aguda en los animales sea el aborto durante el último tercio de la gestación, o el nacimiento de animales prematuros poco viables (Ficht 2003). En bovinos machos provoca alteraciones testiculares y una disminución de la fertilidad, acompañadas algunas veces por abscesos en testículos y epidídimo (Hausler y Koontz 1974).

En humanos la infección se produce a través del contacto con secreciones de animales infectados o consumo de leche cruda o queso contaminado. El consumo de carne no es una fuente de contaminación (Mandell 1995). *Brucella* puede ingresar al organismo a través de lesiones de la piel, mientras se manipulan animales infectados o sus desechos (Mandell 1995, Sauret y Vilissova 2002). En países en que la infección por *Brucella* es endémica en la población animal, la infección por *Brucella* en humanos es frecuente (Roop II y col 1994, Yagupsky 1999), sin embargo, la transmisión persona a persona es extremadamente inusual (Fiori y col 2000). La enfermedad puede ser adquirida por exposición ocupacional de los trabajadores de mataderos, carniceros y veterinarios, al inhalar aerosoles contaminados o en viajes a lugares donde la infección es endémica (Yagupsky 1999). Las infecciones asociadas al trabajo de laboratorio representan el 2% de los casos y se ha informado que el período de incubación de la brucelosis adquirida por accidente en el laboratorio puede variar entre seis semanas a cinco meses (Fiori y col 2000).

7.7.3. GENETICA DE *BRUCELLA*. El ADN de *Brucella* contiene un 58-59% de G + C (guanina y citosina) y el tamaño total del genoma se ha estimado en aproximadamente 2,5 x 10^6 pares de bases (Allardent-Servent y col 1988); este tamaño es menor al de *Escherichia coli* (4,7 x 10^6 pares de bases). Dos características genéticas de *Brucella* llaman especialmente la atención, en primer lugar, la existencia de dos cromosomas circulares en la mayoría de las especies y biotipos, y en segundo lugar, la ausencia de plásmidos. Esta última característica refleja probablemente la adaptación a un nicho ecológico (el ambiente intracelular) estable y sin competencia microbiana, en el que no es necesaria la plasticidad genética que se deriva de los plásmidos y que es propia de ambientes con gran cantidad de microbios (intestino, tierra, etc.). El género *Brucella* tiene seis especies reconocidas, las que exhiben distintas preferencias por su huésped (Mayer 1964) y muestran más de 94% de homología en su genoma (Halling y col 2005), lo que apoya la proposición de que las especies clásicas de *Brucella* son cepas de *Brucella melitensis* (Verger y col 1995). Sin embargo, se ha encontrado polimorfismo en determinadas secuencias genómicas que coinciden con las especies clásicas e incluso con las biovariedades. Se estima, además, que el 8% del genoma de *Brucella* se destina a funciones necesarias para la sobrevivencia y la virulencia, en comparación al estimado para Salmonella que es sólo el 3-4% (Hong y col 2000).

7.7.4. INMUNIDAD FRENTE A *BRUCELLA*

- *Inmunidad natural*. En estados tempranos de la infección por *Brucella*, el rol de la respuesta innata es reducir el número inicial de bacterias promoviendo una respuesta Th1 en el huésped (Ko y Splitter 2003). Los macrófagos, los neutrófilos, las células Natural Killer (NK) y el complemento juegan un rol clave en esta fase temprana de la respuesta a la invasión frente a este microorganismo (Golding y col 2001).
- *Macrófagos*. Los macrófagos juegan un rol central en la respuesta inmune frente a *Brucella*, ya que actúan como células fagocíticas profesionales y como células presentadoras de antígenos. Procesan antígenos en sus compartimentos intracelulares y los presentan en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T, promoviendo de esta manera la respuesta inmune adaptativa (Forestier y col 2000). En este sentido, se ha encontrado que el LPS de *Brucella* interfiere con la vía de presentación de antígenos por MHC clase II (Murphy y col 2002). Las funciones bactericidas de los macrófagos frente a *Brucella* se encuentran centradas en la actividad de las especies reactivas de

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

oxígeno (Oliveira y col 2002) y las especies reactivas de nitrógeno, las cuales son inducidas por IFN-γ y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) (Ko y Splitter 2003).

Los receptores Toll-like (TLR) juegan un rol importante en el inicio de la respuesta inmune innata. Estos receptores presentes en células fagocíticas profesionales reconocen productos microbianos uniéndose directamente a ellos e inducen señales intracelulares que activan factores de transcripción (como NF-kB) que modulan la producción de citoquinas. Estos receptores pueden ser activados por diversos productos microbianos; el receptor Toll-like 4 (TLR4) es activado por LPS, el TLR9 por ADN bacteriano, el TLR2 por productos de la pared celular de bacterias Gram positivas y TLR5 por flagelina (Vasselon y Detmers 2002).

- *Neutrófilos*. Los neutrófilos están implicados en el desarrollo de una defensa temprana frente a una infección por *Brucella* mediante la fagocitosis y posterior destrucción del microorganismo. En primer lugar, los neutrófilos son atraídos al sitio de la infección por estímulos químicos originados o derivados del microorganismo (Wilkinson 1980, Birmingham y col 1982), para posteriormente fagocitar la bacteria, preferentemente opsonizada (Young y col 1985). Una vez que el patógeno es fagocitado, se desarrolla una serie de mecanismosdestructivos en el neutrófilo, con el fin de eliminar la bacteria, mediante el aumento del consumo de oxígeno que lleva a la aparición de radical superóxido, peróxido de hidrógeno y otros radicales derivados del oxígeno, junto con la activación de la enzima mieloperoxidasa y la fusión del lisosoma con los fagosomas que contienen la bacteria, liberándose hidrolasa ácida, glicosidasa, proteasa y lipasa. Sin embargo, la bacteria ingerida puede sobrevivir al mecanismo destructivo de los fagocitos (Smith y Fritzgeorge 1964), gracias a moléculas de bajo peso molecular que inhiben el sistema antibacteriano mieloperoxidasa-peróxido de hidrógeno-haluro (Canning y col 1985). Por ello, aunque los neutrófilos son las primeras células relacionadas con la eliminación de patógenos extraños, ellos son considerados de baja eficiencia contra *Brucella*, ya que esta bacteria puede crecer y sobrevivir en su interior y además es diseminada a través de estos leucocitos a órganos y diferentes localizaciones, desarrollándose una infección persistente.
- *Células Natural Killer*. Las células NK forman parte de la primera línea de defensa contra *Brucella* y una vez que son activadas pueden eliminar células infectadas. *B. abortus* puede activar la actividad lítica de las células NK, estimulando la producción de interleuquina- 12 (IL-12) por parte de las células presentadoras de antígenos. IL-12 además estimula a las células NK a secretar IFN-γ (Fernández y col 1995; Golding y col 2001).
- *Complemento*. Uno de los primeros eventos que ocurren después de la entrada de la *Brucella* al organismo es la activación del complemento por la vía alterna; sin embargo, se ha demostrado que esta vía es incapaz de eliminar la cepa virulenta de *Brucella abortus* 2308 (Eisenschenk y col 1999). Por lo tanto, la lisis de *Brucella* estaría mediada principalmente por la vía clásica del complemento, la cual es dependiente de anticuerpos (Fernández y col 2001).

- *Inmunidad adaptativa*. Está ampliamente aceptado que la inmunidad mediada por células es el mecanismo efector más relevante en la protección frente a *Brucella* debido a que es un parásito intracelular (Oliveira y col 1996). Las citoquinas son moléculas clave para una adecuada respuesta inmune mediada por células (Oliveira y col., 1996). La exposición prolongada de un animal a *Brucella* cambiaría la naturaleza de la respuesta inmune, desde una inmunidad mediada por células hacia una respuesta humoral (caracterizada por la producción de IgM e IgG1), respuesta que se relaciona con una disminución en la actividad de las células T ayudadoras tipo 1, con una baja en la producción de INF-γ, favoreciéndose de esta forma un incremento de la actividad de las células T ayudadoras de tipo 2, disminuyendo la respuesta inmune celular, lo que favorecería de esta forma el establecimiento de la

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

enfermedad crónica (Oñate y col 2000). Las funciones de la respuesta inmune adaptativa en la brucelosis se basan principalmente en tres mecanismos. Primero, la producción de IFN-γ por células T $CD4^+$, $CD8^+$, y células T γδ, que activa la función bactericida en macrófagos. Segundo, la citotoxicidad de células T $CD8^+$ y células T γδ que eliminan macrófagos infectados. Y tercero, isotipos de anticuerpos Th1, tales como IgG2a que opsonizan al patógeno para facilitar su fagocitosis (Ko y Splitter 2003).

En general, se considera que los anticuerpos bloqueadores no son efectivos en la respuesta inmune contra *Brucella* (Corbeil y col 1988). Sin embargo, los animales infectados con *Brucella* producen anticuerpos contra varios componentes bacterianos (Tabatabai y Hennager 1994) que interfieren en la eliminación del patógeno, especialmente aquellos anticuerpos específicos para el antígeno O y algunas porinas. En este sentido, los anticuerpos serían importantes en bloquear la liberación de cantidades demasiado elevadas de *Brucella* al medio extracelular.

- *Linfocitos* T $CD4^+$ y $CD8^+$. Después de la activación de los macrófagos, las células T inmaduras (Th0) se diferencian de células efectoras y de memoria, que están programadas para secretar distintos patrones de citoquinas (Golding y col 2001). Las células Th1 secretan interleuquina-2 (IL-2) e INF-γ, mientras que los linfocitos Th2 producen interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5) e interleuquina-10 (IL-10) (Zhan y col 1995). La generación de células Th1 de memoria sólo puede realizarse si la respuesta inicial al estímulo se asocia a la producción de IL-12 e IFN-γ (Scharf y col 2001).

  El rol principal de la secreción de IFN- γ por las células Th1 en la inmunidad contra *Brucella* es activar la función bactericida de los macrófagos y linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos, así como la estimulación de la secreción de IgG2a (Scharf y col 2001; Ko y Splitter 2003). En términos numéricos, la población celular predominante es la de linfocitos T $CD4^+$ productores de IFN-γ (Ko y Splitter 2003), responsables de la activación de macrófagos y la atracción de células inflamatorias efectoras, de ahí su importancia en promover la respuesta celular adquirida contra *Brucella* (Bae y col 2002, Wyckoff 2002). Además, el IFN-γ inhibe la acción de IL-4 sobre las células T (Scharf y col 2001).

  Las células citotóxicas T $CD8^+$ pueden actuar como células efectoras y eliminar macrófagos infectados con *Brucella* directamente (Oliveira y col 2002; Wyckoff 2002). Las células blanco son reconocidas por las células citotóxicas en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC I) y son eliminadas por la acción de perforinas y granzimas (Golding y col 2001).

- *Linfocitos T* γδ. Las células T γδ representan una pequeña población de linfocitos, con un patrón único de reconocimiento de antígenos (Dieli y col 2003). En humanos, las células T γδ controlan el aumento en el número de microorganismos ya que secretan TNF-α e IFN-γ, después de ser activadas por antígenos no peptídicos, en su mayoría fosfoantígenos, los cuales no son presentados en el contexto del MHC (Giambartolomei y col 2002, Baldwin y col 2002, Ko y Splitter 2003). Mediante la secreción de estas citoquinas, activan la función bactericida de los macrófagos y, además, son capaces de lisar células infectadas por citotoxicidad directa *in vitro*. El rol de estas células *in vivo* aún no ha sido determinado (Ko y Splitter 2003), aunque se cree que son parte de la inmunidad innata (Wyckoff 2002). En bovinos menores de un año, la población celular predominante es la de células T γδ y no la de células T αß, lo que sugiere que el rol de este tipo celular es más significativo en la infección del ganado con brucelosis (Ko y Splitter 2003). De todas maneras, en bovinos, la producción de IFN-γ por estas células es menor que la producida por las células $CD4^+$ (Baldwin y col 2002).

- *Linfocitos B*. Las células B son estimuladas directamente por las células T a través de la interacción de

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

moléculas coestimulatorias como CD40 y su ligando CD40L presente en la célula T, lo cual, junto a las citoquinas liberadas, son importantes en promover el cambio de isotipo de IgM a IgG (Golding y col 2001). Con respecto al rol que cumplirían los anticuerpos durante la infección por *Brucella*, se ha visto que tanto IgM como IgG, en bajas concentraciones, son capaces de promover la lisis de *Brucella* a través de la vía clásica del complemento (Corbeil y col 1988). También se han encontrado títulos elevados de IgG anti-SOD Cu/Zn en animales infectados, pero aún no se determina si estos anticuerpos juegan un rol importante en la inmunidad contra *Brucella* (Tabatabai y Hennager 1994). La opsonización acoplada al aumento de muerte de *Brucella* intracelular podría ser considerada como el principal rol de los anticuerpos contra la infección con *Brucella* (Ko y Splitter 2003). Aunque paradójicamente en brucelosis bovina la alta concentración de IgG durante la infección activa previene la lisis extracelular de la bacteria mediada por complemento y promueve la fagocitosis bacteriana, aumentando la localización intracelular de la bacteria y la extensión de la enfermedad (Ko y Splitter 2003).

- *Citoquinas*. Las citoquinas son moléculas clave en el control de la brucelosis, ya que permiten dirigir las respuestas hacia una respuesta inmune celular o humoral. B. abortus estimularía a las células presentadoras de antígenos para que secreten IL-12, la que induce a los linfocitos Th0 a diferenciarse en linfocitos Th1, secretores de IFN-γ (Splitter y col 1996, Oliveira y col 2002, Ko y Splitter 2003). Sin embargo, otros autores señalan que *Brucella* no es un inductor potente de la secreción de IL- 12 (Pasquali y col 2001). IFN-γ participa en la regulación de los mecanismos defensivos de los macrófagos y es considerado un factor crucial para el desarrollo de la protección contra la infección por *Brucella* (Oliveira y col 1996).

  Interleuquina-18 (IL-18) citoquina sintetizada por macrófagos activados, también estimula la producción de IFN-γ, por lo que actúa sinérgicamente con IL-12 sobre las células T en la estimulación de la respuesta mediada por células contra *Brucella* (Pasquali y col 2002).

  TNF-α contribuye a la resistencia frente a *Brucella* por una vía independiente de IFN-γ, estimula el influjo de fagocitos al sitio de infección y participa en la activación de los macrófagos (Zhan y col 1996).

  IL-10, producida por linfocitos $CD4^+$ Th2, macrófagos activados y algunas poblaciones de células B, inhibe la respuesta Th1, ya que disminuye la capacidad de presentar antígenos de los macrófagos e inhibe la secreción de IFN-γ, por lo tanto, aumenta la susceptibilidad a la infección por *Brucella* (Fernández y Baldwin 1995, Giambartolomei y col 2002).

7.7.5 ANTIGENOS DE *BRUCELLA*. Desde un punto de vista antigénico en *Brucella* existen dos componentes fundamentales: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas (Hinsdill y Berman 1967).

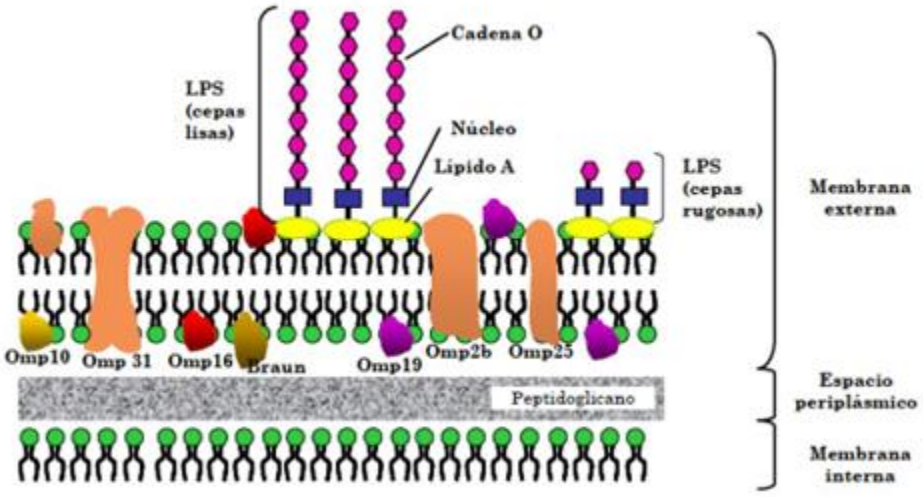
Lipopolisacárido. El LPS es diferente entre cepas rugosas o lisas de *Brucella* (Mandell 1995). Se ha descrito que el LPS de cepa lisa, que contiene polisacárido O, probablemente juega un rol importante en la sobrevivencia intracelular, en comparación con una cepa rugosa que no tiene o tiene muy poca cadena O (Corbell 1997). La falta de una definición genética sobre cepas rugosas naturales, que son patogénicas para su hospedadores, como *Brucella ovis* y *Brucella canis*, confunde tal interpretación. Sin embargo, se ha descrito en *B. ovis* y *B. canis* la presencia de LPS que es idéntico al encontrado en cepas mutantes *lps* de *B. abortus*, mutantes que no tienen cadena O, pero tienen diferente capacidad de sobrevivencia dentro de los macrófagos (Allen y col 1998). La cadena O del LPS es la estructura antigénica más expuesta de esta bacteria, un homopolímero de aproximadamente 100 residuos de 4-formamido-4,6-didesoximanosa (Caroff y col 1984, Corbel 1997, Cloeckaert

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

y col 2002), componente inmunodominante en cepas lisas de *B. abortus*, provocando que animales infectados produzcan anticuerpos específicos contra este antígeno. Los anticuerpos producidos en ratones son principalmente de isotipos IgG2a e IgG_3, con baja producción de IgM (Vemulapalli y col 2000a). Estos anticuerpos representan un componente importante dentro de la inmunidad protectora contra *Brucella*, complementando la respuesta inmune mediada por células (Montaraz y col 1986).

La avidez del LPS para unirse al receptor CD14 de los fagocitos mononucleares se debe al lípido A; esta interacción estimula en estas células la producción del TNF-α, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8), los cuales son mediadores de la mayoría de los síntomas de choque séptico (Aréstegui y col 2001).

El LPS de *Brucella* se diferencia en estructura química y actividad biológica al LPS de bacterias enteropatógenas comunes, ya que no está estabilizado por cationes divalentes; contiene una menor carga negativa y menor cantidad de ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico que el LPS de otras bacterias, disminuyendo así su susceptibilidad a la acción de péptidos catiónicos bactericidas (Folch y Oñate 1995). Las moléculas de manosa que presenta el extremo terminal del LPS de *Brucella* (cepa lisa) favorecen la adherencia a los fagocitos mononucleares del huésped, ya que éstos tienen los receptores de manosa (Pontow y col 1992). Además de los fagocitos mononucleares, las células de la placenta contienen gran cantidad de receptores de manosa, lo que sumado al tropismo de estas bacterias por el eritritol placentario de bovino, aumenta las probabilidades de abortos en estos animales, debido a la presencia de la bacteria en ese tejido (Aréstegui y col 2001).



Proteínas. En estudios sobre componentes estructurales proteicos de relevancia en *Brucella* se han descrito proteínas de membrana externa, proteínas de ubicación citoplasmática y proteínas de choque térmico.
Las proteínas de membrana externa han sido clasificadas en tres grupos: el Grupo I se relaciona con la biosíntesis de la propia envoltura celular y tienen un peso molecular entre 88 a 94 kDa; el Grupo II es equivalente a las porinas de otras bacterias Gram negativas, como Omp 2, OmpC y OmpF y tienen un peso molecular entre 35 a 40 kDa, finalmente, el Grupo III con peso molecular entre 25 a 30 kDa que interacciona fuertemente con el

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

LPS (Verstreate y col 1982, Santos y col 1984, Douglas y col 1984, Verstreate y Winter 1984, Ficht y col 1989). Estos tres grupos de proteínas de membrana externa son reconocidos por el sistema inmune durante el curso de la infección (Bae 1999).

Entre las proteínas citoplasmáticas de importancia destacan la proteína superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD) y la catalasa. La SOD Cu/Zn forma parte del sistema de defensa antioxidante de *Brucella*, el cual protege a la bacteria de los efectos tóxicos de los intermediarios reactivos del oxígeno, ya que transforma los radicales superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno gaseoso (O_2), contribuyendo a la sobrevivencia intracelular de *Brucella* (Ko y Splitter 2003). La proteína SOD Cu/Zn pertenece a la familia de metaloproteínas, clasificada en tres tipos (SOD Cu/Zn, SOD Mn y SOD Fe) dependiendo del metal que se encuentre en el sitio activo. La enzima catalasa ayuda a la proteína SOD Cu/Zn a detoxificar el ambiente bacteriano, actuando sobre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado al interior del macrófago después de la fagocitosis de la bacteria, transformándolo en agua y oxígeno (Aréstegui y col 2001). La expresión de estas enzimas favorecería la permanencia de *Brucella* en el interior del fagocito.

El rol de las proteínas de choque térmico en la patogénesis de *Brucella* es incierto. Se ha observado que en bacterias intracelulares se expresan niveles elevados de proteínas de choque térmico en el ambiente intracelular (Roop II y col 1994, Ko y Splitter 2003, Bae y col 2002). Entre estas se encuentran GroEL (60 kDA), GroES (10 kDa) y HtrA (60 kDa). Las proteínas GroEL y GroES son chaperonas relacionadas con el plegamiento correcto de proteínas, mientras que HtrA (High temperature requirement A stress response protein) es una proteasa que degrada proteínas dañadas oxidativamente (Bae y col 2002). HtrA protege a la bacteria intracelular del daño oxidativo y contribuye a la resistencia de *Brucella* a la destrucción por los fagocitos (Elzer y col 1996). La enzima UvrA repara las lesiones del ADN después del daño oxidativo, como mecanismo de protección bacteriano (Oliveira y col 1996).

Las pruebas indirectas se basan de la respuesta humoral que induce la cadena O del LPS de B. abortus por medio de la producción inicial de IgM 15 seguida de IgG1 e IgG2/IgA; donde estas se producen en muy bajas concentraciones y posteriormente en el curso de la infección se reconoce a IgG1 como el blanco principal en los ensayos serológicos (48). En comparación con las pruebas bacteriológicas, las pruebas serológicas son las más utilizadas por su rapidez, alta sensibilidad, especificidad y bajo costo

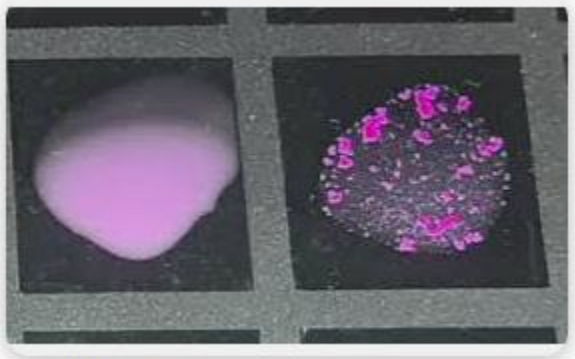
- ROSA DE BENGALA.
  Prueba de Rosa de Bengala (RB). El antígeno Rosa de Bengala consiste de una suspensión de *Brucella* (al 8%) y teñidas con el colorante Rosa de Bengala en un tampón con pH 3,65 ± 0,05. Esta es una prueba de aglutinación que consiste poner en contacto suero del paciente y el antígeno en una placa de aglutinación. Una reacción positiva se observa con la aparición de grumos rosas, con un fondo transparente. Se le considera una prueba de tamizaje, barata, rápida, y específica que detecta anticuerpos aglutinantes IgM e IgG1.

No procesar más de 5 sueros al tiempo.

1. Registrar entrada de sueros en la forma P0001A (ICA)
2. Dejar que los sueros, controles y antígeno lleguen a temperatura ambiente (18°C a 25°C)
3. Homogenizar los sueros controles y muestras en agitador tipo Vortex (confirmar visualmente la NO presencia de crioglobulinas)
4. Identificar el sitio de la placa donde se localizaran los sueros controles y las diferentes nuestras.
5. Depositar 30 µl de los controles positivo y negativo en los lugares identificados.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

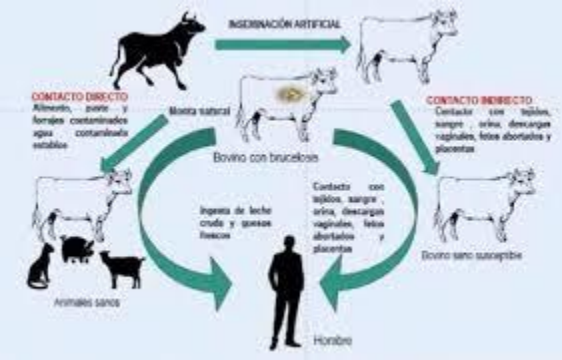
6. Depositar 30 µl de los sueros problema en los casillas identificadas para tal fin. (No procesar más de 5 muestras a la vez si no se cuenta con un mezclados múltiple o 10 si se cuenta con este.)
7. Homogenizar el antígeno con movimientos de inversión suaves.
8. Adicionar 30 µl de antígeno sobre cada uno de los sueros. (controles y muestras)
9. Mezclar los sueros y el antígeno exhaustivamente con el agitador múltiple o con los palillos individuales. (descartar los palillos en el guardián)
10. Para caprino y ovinos la proporción es de 75µl de suero y 25µl de antígeno.
11. Agitar la placa a 20 ciclos por minuto por cuatro minutos. Si la agitación es manual los giros se realizan 6 veces para un lado y 6 veces para el otro por un tiempo de cuatro minutos.
12. Leer los resultados al finalizar este tiempo (máximo en 4 min.) y consignarlos en la forma P 0003a (ICA)
13. Desinfectar la placa con Hipoclorito de Sodio a 5000 ppm por 30min. Al finalizar la prueba.
14. Lavar la placa con detergente neutro.
15. Secar al Horno o a temperatura ambiente.
16. Consignar los resultados que sean fácilmente identificables como positivos o negativos.
17. Se consignas como SOSPECHOSOS en las formas P001 y P003A , las aglutinaciones gruesas o ligeramente perceptibles con bordes tenues o fondo turbio. Le resultado final no debe generarse hasta proceder a confirmarlo con una prueba mas sensible. Si sigue sospechoso pedir por escrito una nueva muestra al usuario.
18. Devolver las muestras al congelador de -20°C y los sueros controles a refrigeración (4°C)

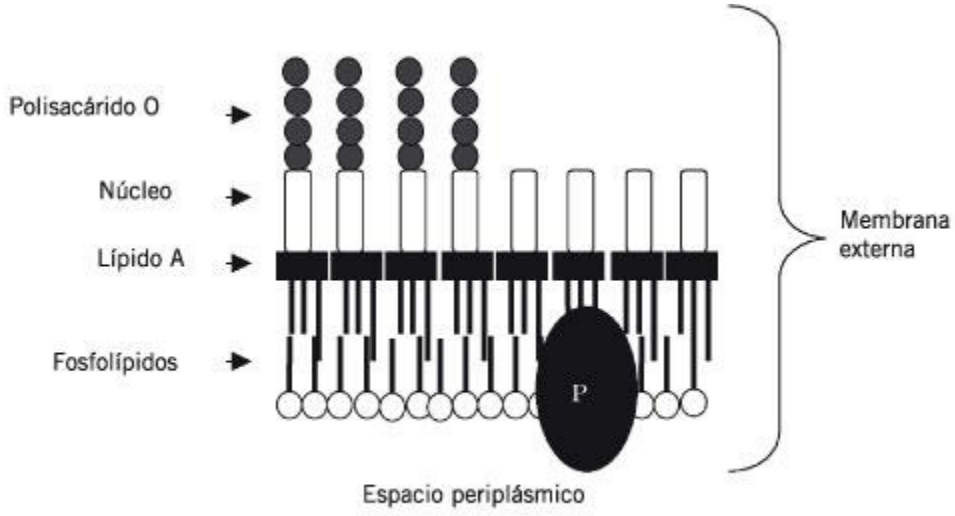


- ELISA INDIRECTA EN SUERO Y LECHE

Las variaciones que existen en el uso de diferentes preparaciones de antígeno como células enteras, LPS O conjugados donde los dos últimos son altamente sensibles para la detección de anticuerpos anti-Brucella en bovinos, sin embargo, esta prueba no diferencia los anticuerpos producidos por la vacunación con cepa 19 (56). Las cepas recomendadas para la producción de antígenos son B. abortus 99 y 1119-3, las pruebas que utilizan LPS como antígeno son proporcionadas por diferentes casas comerciales y han sido validados en muchos ensayos de campo y estas pruebas se realizan tanto en suero como en leche. Al igual que la prueba ELISA competitivo son utilizadas como pruebas de confirmación

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión





ELISA INDIRECTA EN SUERO

1. Verificar estado de los equipos y reactivos.
2. Dejar que los sueros, controles y antígeno lleguen a temperatura ambiente (18°C a 25°C)
3. Revisar el registro de la forma P0001A (ICA)
4. Registrar las muestras en el formato HOJA DE TRABAJO PATRÓN DE UBICACIÓN DE MUESTRAS PRUEBAS DE ELISA INDIRECTA PARA BRUCELOSIS.
5. Homogenizar los sueros controles y muestras en agitador tipo Vortex (confirmar visualmente la NO presencia de crioglobulinas)
6. Preparar el diluyente de muestra del kit a una concentraron de 1X.
7. Diluir los 5 µl sueros controles y problema en 1 ml de diluyente de muestra 1X (Solución primaria)
8. Depositar en toda la placa de prueba 90 µl de buffer. (CON ANTÍGENO)
9. Añadir 20 µl de solución primaria del suero control positivo fuerte en los pozos C1, C2, D1 y D2.
10. Añadir 20 µl de solución primaria del suero control positivo medio en los pozos E1, E2, F1 y F2.
11. Añadir 20 µl solución primaria del suero control negativo en los pozos G1, G2, H1 y H2.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

12. Servir 20 µl solución primaria del suero problema muestra 1 en el pozo A3 y B3 la muestra 2 en el pozo C3 y D3 la muestra 3 en el pozo E3 y F3 y así sucesivamente. (EN LA PLACA CON ANTIGENO)
13. Cubrir la microplaca, agitar e incubar por una hora a 37°C.
14. Preparar el conjugado faltando 10 minutos para que se termine la incubación (según Casa comercial)
15. Lavar cinco veces con PBST 1X, secar con golpes sobre una toalla de papel.
16. Dispensar 100 µl de conjugado por pozo (guardar el sobrante hasta terminar el ensayo)
17. Cubrir la microplaca, agitar e incubar por media hora (30 min) a 37°C.
18. Lavar cinco veces con PBST 1X, secar con golpes sobre una toalla de papel.
19. Adicionar 100 µl de solución reveladora
20. Incubar por 15 min a temperatura ambiente.
21. Pasar al agitador orbital una vez terminado el llenado de la placa.
22. Adicionar 100 µl de la solución de frenado a toda la placa.
23. Leer las placas antes de 1 hora.
24. Registrar la longitud de onda usada en el formato P0002A
25. Verificar la NO presencia de burbujas en la placa y limpiar la base para que no hayan huellas.
26. Pasar los resultados de DO a PP.
27. Escribir los resultados en el formato correspondiente.

ELISA INDIRECTA EN LECHE

1. Verificar estado de los equipos y reactivos.
2. Centrifugar y descartar dos veces la grasa de las muestras a 3.000 r.p.m por 10 min.
3. Dejar que los sueros, controles y antígeno lleguen a temperatura ambiente (18°C a 25°C)
4. Revisar el registro de la forma P0001A (ICA)
5. Registrar las muestras en el formato HOJA DE TRABAJO PATRÓN DE UBICACIÓN DE MUESTRAS PRUEBAS DE ELISA INDIRECTA PARA BRUCELOSIS.
6. Homogenizar los sueros controles y muestras en agitador tipo Vortex (confirmar visualmente la NO presencia de crioglobulinas)
7. Añadir 100 µl de leche control positivo fuerte en los pozos C1, C2, D1 y D2.
8. Añadir 100 µl de leche control positivo medio en los pozos E1, E2, F1 y F2.
9. Añadir 100 µl de leche control negativo en los pozos G1, G2, H1 y H2.
10. Servir 100 µl de las muestras de la forma muestra 1 en el pozo A3 y B3 la muestra 2 en el pozo C3 y D3 la muestra 3 en el pozo E3 y F3 y así sucesivamente. (EN LA PLACA CON ANTIGENO)
11. Cubrir la microplaca, agitar e incubar por una hora a 37°C.
12. Preparar el conjugado faltando 10 minutos para que se termine la incubación (23 mL por frasco 1:2)
13. Lavar tres veces con PBST 1X, secar con golpes sobre una toalla de papel.
14. Dispensar 100 µl de conjugado por pozo (guardar el sobrante hasta terminar el ensayo)
15. Cubrir la microplaca, agitar e incubar por una hora a 37°C.
16. Lavar tres veces con PBST 1X, secar con golpes sobre una toalla de papel.
17. Adicionar 100 µl de solución reveladora (contar 10 min después de llenar la 1° columna)
18. Pasar al agitador orbital una vez terminado el llenadote la placa.
19. Adicionar 50 µl de la solución de frenado a toda la placa.
20. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente antes de la lectura.
21. Registrar la longitud de honda usada en el formato P0002A
22. Verificar la NO presencia de burbujas en la placa y limpiar la base para que no hayan huellas.
23. Pasar los resultados de DO a PP.
24. Escribir los resultados en el formato correspondiente.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- ELISA COMPETITIVA

BRUCELLA cELISA es una prueba cualitativa basada en tecnología ELISA competitiva. Las placas se recubren con lipopolisacárido (LPS) extraído de la bacteria *Brucella abortus*. Cualquier anticuerpo anti-Brucella presente en la muestra competirá con los anticuerpos monoclonales anti-Brucella de ratón, específicos del LPS en el sitio de unión específico a LPS. Los anticuerpos contra LPS son indicativos de infección con una biovariedad lisa de Brucella.
El cELISA de Brucella se puede utilizar para pruebas de confirmación o detección en poblaciones vacunadas y no vacunadas. También se puede utilizar como herramienta complementaria con Brucella FPA en campañas de pruebas masivas. Brucella cELISA es un producto robusto, versátil, altamente sensible y específico. Puede probar varias especies, incluidos bovinos, ovinos y caprinos.

ESTA PRUEBA SOLO PUEDESER REALIZADA POR EL INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO - ICA

7.7.6. VACUNAS CONTRA *BRUCELLA ABORTUS*. La prevención de la diseminación de la brucelosis se basa en la administración de vacunas adecuadas contra la infección por *B. abortus*. Con este objetivo se han utilizado clásicamente cepas bacterianas atenuadas y componentes antigénicos propios de la *Brucella*. La habilidad de un antígeno específico para inducir en forma preferencial una respuesta Th1 es un aspecto importante a considerar en el desarrollo de vacunas contra *Brucella abortus* (Stevens y col 1994, Oliveira y col 1996).

En Colombia las vacunas solo puedes ser aplicadas y distribuidas por las entidades autorizadas por la entidad sanitaria. Bien sea Fedegean, Comités de ganaderos y/o el ICA. En los ciclos de vacunación definidos , los cuales se realizan dos veces al año.

- *Brucella abortus* S19. La cepa 19 de *Brucella abortus* es una cepa lisa que posee la cadena O del LPS, por ello, en animales inmunizados con esta cepa se pueden observar anticuerpos específicos contra este antígeno del tipo IgG1, IgG2b e IgM (Vemulapalli y col 2000a). El defecto genético que permite la atenuación de esta cepa aún no ha sido definido, pero hace que pierda un mecanismo de virulencia esencial (Briones y col 2001). Su efectividad en el ganado bovino depende de variables como la edad de vacunación, dosis, ruta de administración y de la prevalencia de la brucelosis en el rebaño vacunado (Schurig y col 2002). Los anticuerpos inducidos por la vacunación con esta cepa interfieren con el diagnóstico tradicional de bovinos infectados con cepas silvestres de *B. abortus*, por lo que tiene un uso limitado en la vacunación del ganado; esta cepa puede también inducir aborto en hembras preñadas y es patógena para la especie humana (WHO 1997, Oliveira y Splitter 1996, Olsen 2000).

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



La vacuna de cepa 19 fue derivada de un aislamiento de B. abortus en 1923 que fue dejada inadvertidamente a temperatura ambiente durante un año. La cepa derivó su nombre del hecho de ser el decimonoveno cultivo de una serie aislada por el Dr. John Buck. Se encontró que la cepa 19 era menos virulenta que las cepas de campo de B. abortus, sensible a la penicilina (5 U/ml), sensible al azul de tionina (1:500.000) y estable in vivo. La inoculación del ganado con cepa 19 induce una protección significativa contra abortos o infecciones causadas por cepas virulentas de B. abortus y entrega inmunidad casi de por vida contra la brucelosis. Los experimentos de campo usando cepa 19 se iniciaron en 1936, la cual fue adoptada como una vacuna antibrucélica oficial para los Estados Unidos en 1940. Aunque la cepa 19 es efectiva en entregar protección duradera contra la brucelosis, tiene varias propiedades desventajosas. Una desventaja importante radica en que la vacunación del ganado con cepa 19 induce respuestas serológicas que no pueden diferenciarse fácilmente de las respuestas inducidas por las cepas de campo de B. abortus. Luego, las respuestas inmunológicas a la cepa 19 pueden menoscabar la identificación precisa de animales individuales infectados con cepas de campo. Aunque la vacunación de terneras entre los 4 y 12 meses de edad reduce la incidencia, las respuestas inmunológicas pueden persistir hasta la edad adulta en un pequeño porcentaje de terneras de vacuna. Una segunda desventaja son las observaciones que indican que la cepa 19, aunque menos virulenta que las cepas de campo, puede inducir la artritis en las vacunaciones de terneras, la que se estima persiste hasta la edad adulta en 2 de cada 100.000 vacunaciones. La exposición accidental de personas a la cepa 19 puede inducir síntomas clínicos de brucelosis. Aunque la disminución de la dosis de cepa 19 hará disminuir la incidencia de aborto en el ganado gestante, los problemas de diagnóstico asociados con los títulos inducidos por la vacuna ha menoscabado el uso de la cepa 19 como una vacuna para ejemplares adultos. No obstante las varias propiedades desventajosas, la cepa 19 ha sido aplicada exitosamente en los programas de brucelosis a nivel internacional. Se ha estimado que aunque la vacunación con cepa 19 no brinda una protección absoluta, el 65-70% de los animales vacunados están completamente protegidos, y en rebaños en los cuales la mayor parte de los novillos y terneras están vacunados, la infección animal se reduce en un 80% y la infección del rebaño en un 20%.

- Cepa RB51 de B. abortus fue aislada mediante fases repetidas de cepa 2308 de B. abortus sobre medios conteniendo ripamficina y penicilina. Ya que RB51 no expresa nada, o cantidades mínimas, de la cadena lateral O del lipopolisacárido, el ganado vacunado con esta cepa permanece seronegativo ante las pruebas de diagnósticos convencionales de brucelosis. La administración de la cepa RB51 al ganado adulto que recibió la vacuna de cepa 19 en el período de terneras, no produjo respuestas anamnésticas posibles de detectarse en pruebas serológicas antibrucélicas. La vacunación de terneras (4-10 meses de edad) con 1 x 1010 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) de cepa RB51 induce una inmunidad

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

contra el desafío con Brucella experimental que es similar a la inducida por la vacuna de cepa 19. Sin embargo, al contrario de la vacunación con cepa 19, los animales infectados con cepas de campo pueden ser detectados serológicamente en todo momento después de la vacunación con RB51. La cepa RB51 es eliminada de los tejidos linfáticos con mayor rapidez que la cepa 19 y, al contrario de la cepa 19, no está asociada con una linfocitopenia significativa. La vacunación del ganado adulto con una dosis reducida de cepa RB51 (1 x 109 UFC) induce una alta protección contra el desafío con Brucella experimental en la gestación subsiguiente. Aunque en estudios de campo la dosis de 1 x 109 UFC ha demostrado ser segura para los animales en gestación, se han registrado abortos después de la administración inadvertida de la dosis completa para el período de ternera durante la gestación. La cepa 19 fue reconocida en 1940 como la vacuna antibrucélica oficial para el ganado en los Estados Unidos. Con su aprobación como vacuna oficial en 1996, la cepa RB51 se convirtió en la primera nueva vacuna antibrucélica para el ganado en los Estados Unidos en más de 50 años. 47Un poco tiempo después de su reconocimiento como vacuna oficial, la cepa RB51 reemplazó a la cepa 19 en todos los estados que permiten la vacunación antibrucélica. La investigación continua en los Estados Unidos está caracterizando la duración de inmunidad en el ganado y evaluando su uso en la fauna salvaje infectada con B. abortus. Actualmente, la cepa RB51 está siendo usada, o considerada para usarse, en numerosos países. La cepa RB51 ha demostrado proteger contra B. suis en cerdos y estudios en ratones han sugerido que puede inducir inmunidad contra B. melitensis. Sin embargo, un estudio en ovejas informó que la vacunación con cepa RB51 no protege a los carneros contra B. ovis.



7.8 AFTOSA

La fiebre aftosa es una enfermedad animal transfronteriza que afecta gravemente la producción de ganado, alterando el comercio regional e internacional de animales y productos de origen animal. Se estima que la enfermedad circula en el 77% de la población mundial de ganado en África, Oriente Medio y Asia, así como también en un área limitada de América del Sur. Los países actualmente libres de fiebre aftosa permanecen bajo amenaza constante del ingreso de la enfermedad. El 75% de los costos atribuidos al control y prevención de la fiebre aftosa son incurridos por países de ingresos bajos y de ingresos medianos-bajos. África y Eurasia son las regiones que incurren en los mayores costos, representando el 50% y el 33% de los costos totales, respectivamente. La tasa de morbilidad puede llegar al 100% en poblaciones de ganado susceptibles. Una estrategia global para el control de la fiebre aftosa fue aprobada en 2012.

La fiebre aftosa es una enfermedad vírica grave del rebaño, sumamente contagiosa y de repercusiones económicas considerables. Afecta a los bovinos y porcinos así como a los ovinos, caprinos y otros rumiantes biungulados. Todas las especies de ciervos y antílopes como también elefantes y jirafas son susceptibles a esta

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

enfermedad.

En una población susceptible, la morbilidad es de casi un 100%, siendo los animales de cría intensiva más susceptibles que las razas tradicionales. La enfermedad es rara vez fatal en los animales adultos, pero la mortalidad entre los animales jóvenes suele ser alta debido a la miocarditis o a la falta de amamantamiento si la madre está afectada por la enfermedad.

La fiebre aftosa se caracteriza por fiebre y úlceras en forma de ampollas en la lengua y labios, en la boca, en las ubres y entre las pezuñas. Ocasiona graves pérdidas de producción y aunque la mayoría de animales afectados se recupera, la enfermedad a menudo los deja debilitados.

El organismo causante de la fiebre aftosa es un aftovirus de la familia *Picornaviridae*. Existen siete cepas (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1), y para cada una se necesita una vacuna específica a fi n de proporcionar la inmunidad de un animal vacunado.

La fiebre aftosa es una enfermedad inscrita en la lista del *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, fundada como OIE) y debe ser declarada a la OMSA (*Código Sanitario para los Animales Terrestres*). Es la primera enfermedad para la cual la OMSA ha establecido una lista oficial de países y zonas reconocidos libres con o sin vacunación

La fiebre aftosa es una enfermedad vírica grave del rebaño, sumamente contagiosa y de repercusiones económicas considerables. Afecta a los bovinos y porcinos así como a los ovinos, caprinos y otros rumiantes biungulados. Todas las especies de ciervos y antílopes como también elefantes y jirafas son susceptibles a esta enfermedad.
En una población susceptible, la morbilidad es de casi un 100%, siendo los animales de cría intensiva más susceptibles que las razas tradicionales. La enfermedad es rara vez fatal en los animales adultos, pero la mortalidad entre los animales jóvenes suele ser alta debido a la miocarditis o a la falta de amamantamiento si la madre está afectada por la enfermedad.
La fiebre aftosa se caracteriza por fiebre y úlceras en forma de ampollas en la lengua y labios, en la boca, en las ubres y entre las pezuñas. Ocasiona graves pérdidas de producción y aunque la mayoría de animales afectados se recupera, la enfermedad a menudo los deja debilitados.
El organismo causante de la fiebre aftosa es un aftovirus de la familia *Picornaviridae*. Existen siete cepas (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1), y para cada una se necesita una vacuna específica a fi n de proporcionar la inmunidad de un animal vacunado.
La fiebre aftosa es una enfermedad inscrita en la lista del *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, fundada como OIE) y debe ser declarada a la OMSA (*Código Sanitario para los Animales Terrestres*). Es la primera enfermedad para la cual la OMSA ha establecido una lista oficial de países y zonas reconocidos libres con o sin vacunación.
Asimismo, los Miembros pueden solicitar a la OIE el reconocimiento oficial de sus programas de control de la fiebre aftosa.

Transmisión y propagación
La fiebre aftosa se encuentra en todas las excreciones y secreciones de los animales infectados. El virus puede estar presente en la leche y el semen durante hasta 4 días antes de que el animal muestre signos clínicos de la enfermedad.
Los animales que se han recuperado de la infección o aquellos vacunados con vacunas de virus vivos pueden actuar como portadores del virus.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Los animales infectados liberan, entre otras cosas, una gran cantidad de virus en forma de aerosol y pueden infectar a otros animales por vía respiratoria u oral.

La importancia de la fiebre aftosa está ligada a la facilidad con que el virus se difunde por los siguientes medios:

- introducción de nuevos animales portadores del virus (saliva, leche, semen, etc.) que pueden contagiar a un rebaño;
- corrales, edificios o vehículos contaminados utilizados para la estabulación y desplazamiento de animales susceptibles;
- materiales contaminados tales como paja, piensos, agua, leche o productos biológicos;
- prendas o calzado contaminados de las personas, o equipos usados contaminados;
- carne o productos animales infectados con el virus, crudos o insuficientemente cocidos, y utilizados en la alimentación de animales susceptibles; y
- dispersión en aerosol del virus de una propiedad infectada vía las corrientes de aire.

La gravedad de los signos clínicos dependerá de la cepa vírica, de la edad y de la especie animal.
Los signos pueden fluctuar desde una infección leve hasta grave. Los bovinos y porcinos de cría intensiva presentan signos más graves que los ovinos y caprinos.
El signo clínico característico es la aparición de ampollas (o vesículas) en la nariz, lengua, labios, cavidad oral, entre los dedos, encima de las pezuñas, ubres y puntos de presión en la piel. Las ampollas reventadas pueden ocasionar cojera extrema y desgana para moverse o inapetencia. Las ampollas abiertas también pueden dar lugar a infecciones bacterianas secundarias. Otros síntomas observados con frecuencia son fiebre, depresión, hipersalivación, pérdida de apetito y de peso, caída de la producción de leche.

La salud de los terneros, corderos, cabritos y cerditos jóvenes puede verse comprometida por la falta de leche de las madres infectadas. En caso de infección con el virus de la fiebre aftosa, la muerte puede acaecer antes de que aparezcan las ampollas debido a los estragos que el virus causa en el músculo cardíaco.

Las ampollas se curan en general en un plazo de al menos 7 días, sin embargo el impacto de la enfermedad sobre las tasas de crecimiento o de producción lechera puede persistir tras la recuperación. Los animales que se han recuperado de la infección pueden a veces ser portadores del virus e iniciar nuevos focos de la enfermedad.

Las medidas iniciales en la estrategia global ante la fiebre aftosa incluyen los sistemas de detección temprana y alerta y la adopción de medidas de prevención conforme a las Directrices de la OMSA para la vigilancia de la fiebre aftosa (*Código Sanitario para los Animales Terrestres*). De este modo, se facilita el seguimiento y control de la aparición, prevalencia y caracterización de virus de la fiebre aftosa.

La protección de los países, áreas o zonas libres de fiebre aftosa podrá mejorarse mediante la vigilancia y controles estrictos de las importaciones y los desplazamientos de animales en las fronteras.

Es esencial que los propietarios y productores pecuarios mantengan prácticas eficaces de bioseguridad para prevenir la introducción o propagación del virus. Las medidas recomendadas en las explotaciones comprenden:

- control del acceso de las personas y equipos al rebaño;
- control de la introducción de nuevos animales en un rebaño existente;
- mantenimiento de la higiene de corrales, edificios, vehículos y equipos utilizados para el rebaño;
- seguimiento y control y notificación de la enfermedad

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- eliminación adecuada del estiércol y de las canales.

Los planes de contingencia en caso de eventuales focos identificarán los elementos considerados en la respuesta para erradicar la enfermedad:

- destrucción en condiciones decentes de todos los animales infectados, recuperados y de contacto susceptibles a la fiebre aftosa (*Código Sanitario para los Animales Terrestres*);
- eliminación adecuada de las canales y de todos los productos animales (*Código Sanitario para los Animales Terrestres*);
- vigilancia y seguimiento de rebaños potencialmente infectados o expuestos;
- cuarentena estricta y control de los desplazamientos del rebaño, equipos, vehículos; y
- desinfección total de los establecimientos y de todo material infectado (implementos, vehículos, prendas de vestir, etc.).

En los países o zonas endémicos, la eliminación selectiva puede complementarse con la vacunación del rebaño susceptible. Las vacunas usadas deberán proteger contra la cepa particular del virus prevaleciente en dicha área.

VACUNACION CONTRA LA FIEBRE AFTOSA:

El Programa Nacional de Fiebre Aftosa tiene establecido que la vacunación se realice en forma obligatoria, cíclica y masiva en todos los animales de las especies bovina y bubalina, independientemente de su edad.

De acuerdo a la Ley 395/95, la vacunación se realiza dos ciclos anuales, autorizados por Resolución de la Gerencia General del ICA, que se llevan a cabo en los meses de mayo - junio y noviembre - diciembre respectivamente, cada uno con duración de 45 días.

En cada ciclo el ICA:

- Autoriza cada una de las Organizaciones Ganaderas Ejecutoras antes de comenzar el ciclo, sobre la base de visitas de verificación del cumplimiento de las condiciones arriba señaladas.
- Evalúa en conjunto con FEDEGAN-FNG y los laboratorios productores de vacuna, la disponibilidad de biológico antes de comenzar el ciclo a fin de asegurar que se dispone de las dosis requeridas para cubrir las necesidades de todo el país.
- Coordina además, con FEDEGAN-FNG, reuniones semanales de seguimiento a nivel local y regional con sus respectivas actas, en las cuales las Organizaciones Ganaderas Ejecutoras entregan al ICA informes parciales del avance del ciclo y copias de los RUV expedidos.
- Da recomendaciones para ajustes o mejoras en el desarrollo del ciclo de vacunación en la zona para lograr las metas del programa.
- Supervisa y registra la remisión de biológico desde los laboratorios productores a los distribuidores a nivel regional y local, para lo cual se elaboran actas.
- Supervisa la conservación, aplicación y registro de la vacuna.

Una vez finalizado el ciclo, con base en las reuniones regionales y en una reunión final nacional de evaluación, el ICA y FEDEGAN revisan aspectos técnicos, operativos y logísticos del ciclo para mejora del programa.

En cada ciclo, la vacunación es ejecutada por más de 2.000 funcionarios entre programadores y vacunadores contratados por las Organizaciones Ganaderas Ejecutoras y UMATAs autorizadas por el

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

ICA en todo el país.

En las demás especies susceptibles existentes en Colombia (porcinos, ovinos y caprinos), no está autorizada la vacunación. Solo en casos muy especiales, se han autorizado vacunaciones de forma estratégica, así como en casos de control y erradicación de focos. Estas vacunaciones son autorizadas y supervisadas por el ICA como Servicio Veterinario Oficial.

Una vez finalizado cada ciclo, FEDEGAN-FNG y el ICA evalúan la disponibilidad de dosis de vacuna remanente del ciclo que termina, el número de dosis en proceso de aprobación y registro, y el número de dosis ya registradas.

Solicitan además a los laboratorios productores su programación y realizan una proyección a la fecha de inicio del ciclo que se esta proyectando. De esta manera, el país viene asegurando por anticipado que se va a disponer del suficiente número de dosis de vacuna para cubrir la necesidad nacional.

Los porcentajes de vacunación en el país se han incrementado a partir de 1.997, año en que el gremio ganadero a través de FEDEGAN-FNG inició su participación como ejecutor de las campañas de vacunación del Programa de Erradicación.



8. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha de Revisión	Versión	Descripción del cambio	Responsable
Julio 23 de 2022	001	Se actualizan los recursos e insumos que se requieren para la prueba (6.2). Se actualiza el párrafo de Material de Referencia. Se actualiza la descripción de IBR (7.4.2). Se eliminan las columnas de 2 placas en (7.1.2), (7.3.2. c), (7.4.2.c). En el numeral 7.2.1 c se eliminan las columnas de 2 y de 10 placas. En todo el procedimiento se elimina como muestra la leche, ya que solo se realiza en suero.	Jeanethe Rojas R. Gerente de Calidad.
Noviembre 2 de 2024	002	Se incluye información de enfermedades de importancia en	Luisa Cortes

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

		la producción bovina. Se incluyen procedimientos dentro del manual de rumianted	Gerente de Calidad.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

1. 1

2. 2

3. 2

4. 2

5. 4

RECURSOS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS 5

6. 6

7. 7

8. 11

9. 13

10. 15

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

1. INTRODUCCIÓN

El Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab ha implementado pruebas de laboratorio por el método de microscopía que facilitan el diagnóstico de diversas alteraciones en los diferentes sistemas de pequeñas y grandes especies.

2. PROPÓSITO

Unificar los procedimientos para las pruebas de microscopía realizadas en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.

3. ALCANCE

Aplica para la ejecución de los ensayos descritos en el presente POE, de acuerdo con el Numeral 7.2 Selección, Verificación y Validación de Métodos y 7.7 Aseguramiento de la Validez de los Resultados NTC-ISO/IEC 17025:2017

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Manual de procedimientos para el laboratorio clínico veterinario en el centro de recepción y rehabilitación de fauna silvestre del DAMA. Autores: Acero E.J., Ramírez C., Cuadros L.M., Bernal J., Molano F., Sánchez A. Mahecha Y.

GREEN BOOK DEOK del veterinario. Pequeños animales. Piñeiro, Carlos. Madrid, 1995

4° CURSO-SEMINARIO INTERNACIONAL DE ICTIOPATOLOGÍA Y PATOLOGÍA VETERINARIA - 1 CURSOSEMINARIO INTERNACIONAL DE PATOLOGÍA TOXICOLÓGICA 21-25 de agosto 2012 LUGAR: UNIVERSIDAD NACIONAL – FACULTAD DE VETERINARIA- BOGOTA D.C. FECHA: AGOSTO 21 a 24 de 2012 CONFERENCISTAS: Dra. Margaret Miller (Purdue University), Dr. David Vail (University of Wisconsin), y Dra. Carolina Escobar Troncoso (Universidad Santo Tomás, Chile), Dr. Iregui (Universidad Nacional de Colombia)

Bartges, J. and Polzin, D., 2011. Nephrology and urology of small animals. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

5. DEFINICIONES

- **ANESTRO:** Estado de inactividad sexual en animales hembras durante el cual no presentan ciclo estrógeno.
- **BIOPSIA:** Es la extirpación de tejido para evaluación médica.
- **CÉLULA:** Es la unidad más pequeña que puede vivir por sí sola y que forma todos los organismos vivos y los tejidos del cuerpo. Las tres partes principales de la célula son la membrana celular, el núcleo y el citoplasma. La membrana celular rodea la célula y controla las sustancias que entran y salen.
- **CÉLULA EPITELIAL:** Es una célula generalmente grande y de forma redonda o poligonal, con márgenes celulares fáciles de identificar. Estas células suelen formar grupos, que son agregados de células que establecen contacto de membrana a membrana (adhesión).
- **CÉLULA MESENQUIMAL:** Es una célula generalmente de tamaño mediano, alargada, en forma de huso o pleomórfica. Estas células pueden formar agregados de células.
- **CÉLULA SOMÁTICA: E**s cualquier célula del cuerpo excepto los espermatozoides y óvulos. Las células somáticas son diploides, es decir, que contienen dos juegos de cromosomas, uno heredado de cada padre.
- **CITOLOGÍA:** Es el estudio de las características de las células que contiene alguna muestra (secreción vaginal, esputo, etc.). Abarca todo lo relacionado con su estructura y sus funciones.
- **GERMINAL**: Son los gametos, es decir los óvulos y los espermatozoides.
- **DIESTRO:** El diestro comienza cuando la hembra vuelve a rechazar al macho para la monta y tiene una duración aproximada de 2-3 meses. Las secreciones vaginales van desapareciendo hasta convertirse en mucosas y la vulva se va reduciendo hasta su tamaño habitual.
- **ESTRO**: Período de receptividad sexual, al final del cual se produce la ovulación (hormona relacionada: LH).
- **MASTITIS:** Inflamación del tejido mamario producida por una infección.
- **MICROSCOPIA:** Técnica de laboratorio que permite la observación de objetos microscópicos. Es útil en el diagnóstico de laboratorio clínico para la observación de morfologías celulares, estructuras bacterianas, parasitarias o fúngicas**.**
- **PATOLOGÍA:** Es el estudio de los trastornos anatómicos y fisiológicos de los tejidos y los órganos de los seres vivos.
- **PROESTRO:** Periodo de crecimiento folicular que se inicia con la regresión del cuerpo lúteo y culmina con la aparición del estro. (hormona relacionada: FSH).

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

RECURSOS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS

- **INSUMOS – REACTIVOS:**

  - Coloración de Wright
  - Buffer Giordano
  - Tubos de ensayo.
  - Tiras reactivas para orina.
  - Láminas porta objetos
  - Láminas cubreobjetos
  - Puntas para pipeta de 100-1000ull
  - Guía con 2 superficies de 1 cm^2 cada una.
  - Alcohol

- **EQUIPOS:**

  - Refractómetro.
  - Centrifuga.
  - Microscopio.
  - Pipeta de 100-1000ul
  - Baño serológico

- **ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL:**

  - Uniforme.
  - Guantes de látex.
  - Gorro.
  - Tapabocas.
  - Zapato antideslizante.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

6. PARCIAL DE ORINA - UROANÁLISIS

TÉCNICA: PARCIAL DE ORINA - UROANÁLISIS

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Orina de cualquier especie animal.	Uro análisis en muestras biológicas de orina.	Uroanálisis - Microscopía	Cualitativo	15 min

- No olvide marcar todos los recipientes y elementos que utilice durante la prueba
- Mezcle suavemente la muestra invirtiendo el recipiente al menos unas 5 veces.
- Realizar la medición de gravedad específica.
- Transfiera 5 mL de orina bien mezclada a un tubo de centrífuga transparente, guardando el resto de la muestra para cualquier otra prueba o si se debe repetir.
- Si hay < 5mL, transferir todo el volumen disponible al tubo.
- Observar aspecto y color de la orina.
- Usar tira reactiva y medir parámetros químicos. Las instrucciones se encuentran en el inserto de la caja del producto, por lo general, se sumerge la tira reactiva en el tubo sin centrifugar, procurando que moje las almohadillas, se seca de manera horizontal evitando que los reactivos se mezclen entre sí.
- Cronometrar la reacción durante un minuto.
- Transcurrido el tiempo especificado, leer inmediatamente los resultados exceptuando los leucocitos, éstos deben leerse 120 segundos después.
- Si la muestra tiene mucha sangre o está muy turbia, se debe repetir el análisis utilizando una nueva tira con el sobrenadante de la muestra centrifugada.
- Posteriormente, se centrifuga la muestra. La centrífuga debe ajustarse durante 5 minutos de 2.000 a 3.000 rpm.
- Retirar el sobrenadante por decantación o utilizando una pipeta, evitando tocar el sedimento.
- Agitar el tubo tratando de desprender el sedimento del fondo.
- Con otra pipeta, transferir una pequeña gota del sedimento en la lámina cubriéndola con una laminilla. Debe haber suficiente líquido para llenar el área del cubreobjetos, pero no tanto como para hacerlo flotar.
- Leer con el objetivo de 10X y 40X.
- Realizar recuentos promediados de leucocitos, hematíes y otras células. Revisar la cantidad de bacterias y reportar los resultados en escala semi-cuantitativa por cruces (de una a tres cruces).

ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS: Utilizar controles semanales para las tiras reactivas de orina, registrar los resultados en el LBFMT015 Formato Control Interno Tiras de Orina.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

7. CITOLOGÍA VAGINAL

TÉCNICA: CITOLOGÍA VAGINAL

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Extendido de hisopado vaginal	Determinación del ciclo estral canino en muestras biológicas de extendido vaginal	MICROSCOPIA	Cualitativo	30 Minutos

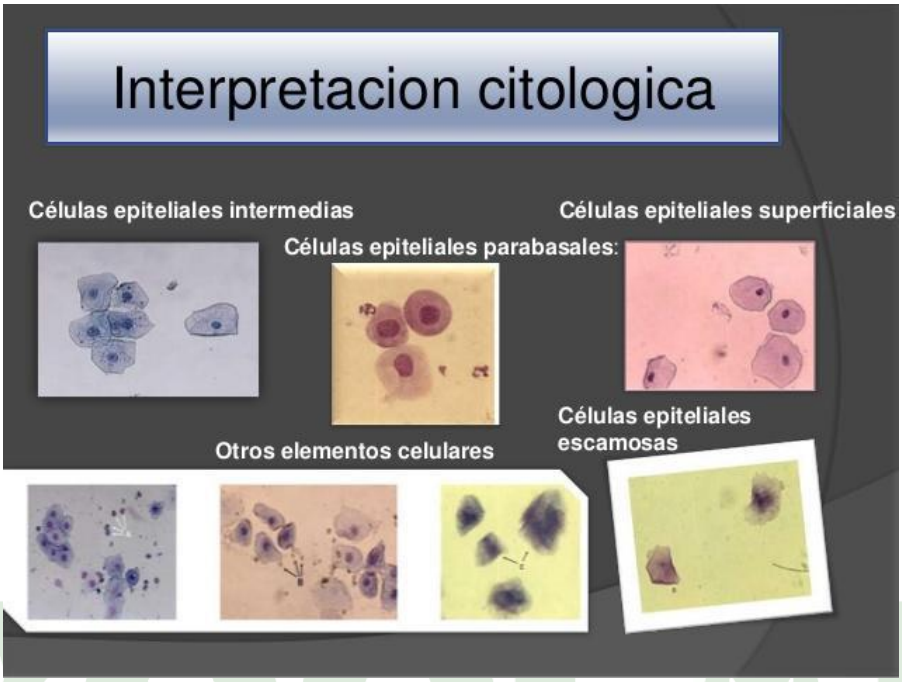
- Recuerde marcar las láminas y demás elementos que utilice durante la prueba.
- Fijar el extendido
- Colorear el extendido con Coloración de Wright de acuerdo al LBPOE018 Hematología.
- Observar las células en el extendido y definir la fase estral de acuerdo a la siguiente guía (Fotografías de citologiaveterinaria.bligoo.com.co)



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido



8. RECUENTO DE CELULAS SOMATICAS

TÉCNICA: Microscopia

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Leche de tanque o individual	Determinación de la concentración de células somáticas	MICROSCOPIA	Cualitativo	30 minutos

El **recuento de células somáticas** en la leche es un indicador del estado general de salud de la glándula mamaria de la hembra lactante, el cual es ampliamente utilizado para el mejoramiento de la calidad en producción lechera. La reducción de recuento de células somáticas es una prioridad para veterinarios y productores, ya que existe una relación entre éste y la pérdida de leche.

El término 'recuento de células somáticas - RCS' o 'Conteo de Células Somáticas - CCS' indica una concentración de los diferentes leucocitos y células epiteliales en un mililitro de leche. Actualmente, el recuento de células somáticas es ampliamente aceptado como método clásico para monitorear el estado de salud de la glándula mamaria de la hembra lechera.

Generalmente, un incremento en el nivel del RCS indica un mayor nivel de infección subclínica en la glándula mamaria. El interés de veterinarios y productores por reducir el RCS está asociado con la relación que existe entre el nivel de RCS y las pérdidas de producción de leche. Un menor nivel de RCS está también relacionado

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

con mayores contenidos de proteína y de grasa, menos casos de mastitis clínica, mayor producción de queso, y mejor calidad y estabilidad de los productos lácteos.

Tipos de células en la leche	
Macrófagos	60%
Linfocitos	25%
Neutrófilos	25%

Fuente: Philpot, 2001; Wolter et al., 2004.

CELULAS SOMATICAS

- En su mayoría leucocitos y células epiteliales
  - de la glándula mamaria
- Niveles de células somáticas
  - bajo <100.000 - 200.000
  - medio 200.000 - 500.000
  - alto 500.000 - 1.000.000
  - muy alto >1.000.000
- Niveles de corte para pago por calidad
  - Chile : 300.000 - 400.000

Carrillanca DPA NEO 1997

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

CELULAS SOMATICAS

- Importancia relativa de valores comparados de CS
  - bajo 80.000 135.000 aceptable
  - bajo 80.000 145.000 no aceptable
  - medio 400.000 540.000 aceptable
  - medio 400.000 560.000 no aceptable
  - alto 750.000 900.000 aceptable
  - alto 750.000 990.000 no aceptable
  - muy alto 1.500.000 1.850.000 aceptable

Cartilla DPA 1989 1997

9. HISTOPATOLOGÍA

TÉCNICA: HISTOPATOLOGÍA

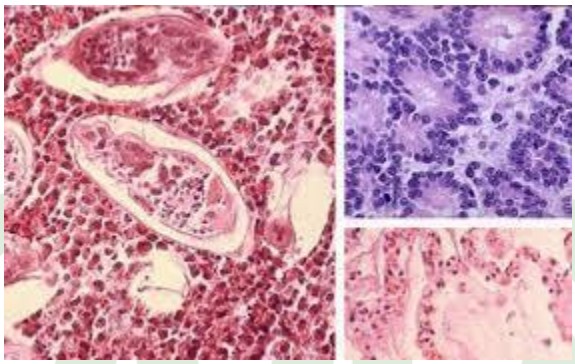
SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Biopsias de tejidos	Histopatología	Microscopía	Cualitativa	10 días.

La histopatología consiste en el análisis de tejidos, incluyendo resecciones quirúrgicas y biopsias de piel, endoscópicas y de médula ósea, entre otras. Las biopsias son sometidas a un proceso complejo que incluye los siguientes pasos:

- Fijación y la deshidratación de los tejidos.
- Impregnación en parafina para obtener bloques sólidos.
- Corte en láminas delgadas.
- Extensión y coloración.
- Evaluación microscópica.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido





La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

10. CITOPATOLOGÍA

TÉCNICA: CITOPATOLOGÍA

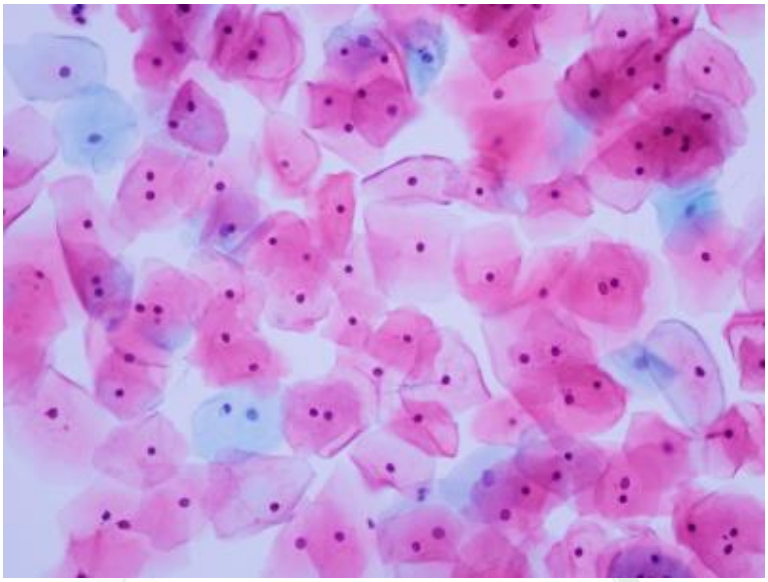
SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Aspirados, frotis, impresiones, raspados	Citopatología	Microscopía	Cualitativa	10 días

En esta técnica se analizan células, a diferencia de la histopatología que se enfoca en el análisis de tejidos. Una ventaja de la cito patología es que el diagnóstico es más rápido, más económico y menos invasivo. La desventaja es que la información es limitada, ya que no se obtienen datos sobre la arquitectura tisular. Está indicada en: efusiones, nódulos linfáticos, lesiones cutáneas, masas abdominales, para determinación de metástasis. Las muestras pueden ser obtenidas por varios métodos:

- ASPIRADO AGUJA FINA (PAF): Puede hacerse con o sin aspiración. Se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

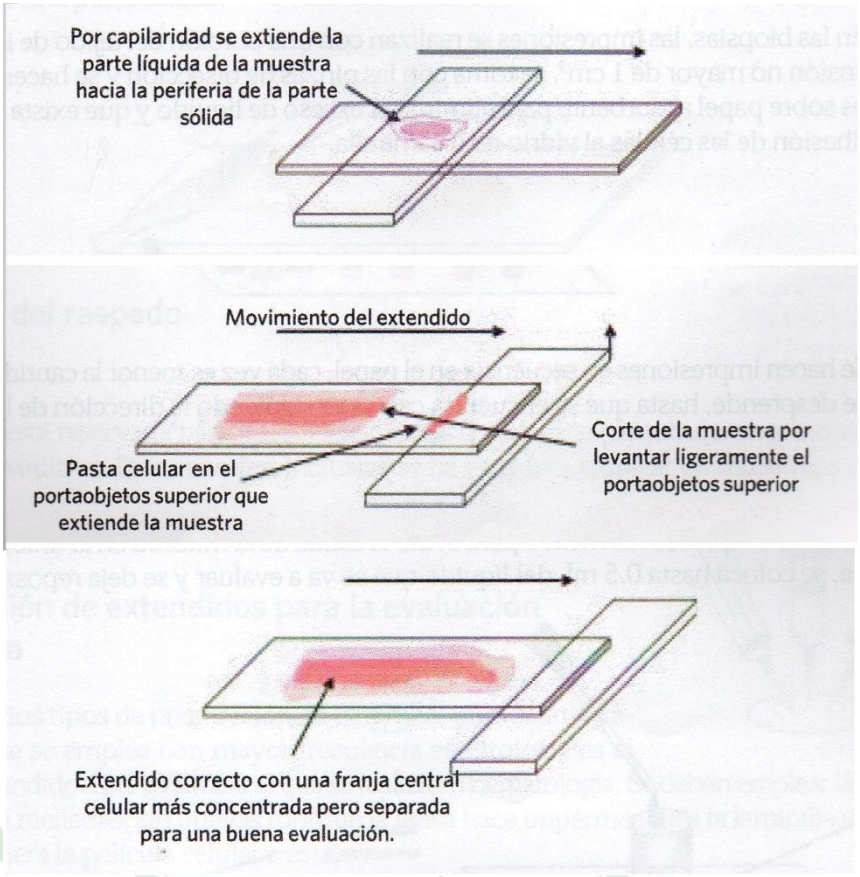
- ✓ Usar aguja calibre 20-22 de 1 a 1.5 pulgadas.
- ✓ Usar jeringa 6-12cc para un buen aspirado.
- ✓ Aspiración: se recomienda cuando las masas son muy duras, se debe redirigir la aguja y empujar el émbolo hacia atrás.
- ✓ Sin aspiración: Sirve para la mayoría de lesiones, redirigir y repetir varias veces.
- ✓ Al colocar la muestra, colocar la aguja en contacto con la lámina, si se hace desde lejos la muestra queda salpicada.
- ✓ Si hay fluido se debe colocar en un tubo con EDTA.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido



✓ Hacer el extendido en squash:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido



Las tinciones utilizadas son de tipo Romanowsky, tales como Wright y Giemsa.

11. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha de Revisión	Versión	Descripción del cambio	Responsable
2013-02-09	001	LBINS015: Aclaración código registro num 1,17	CYC
2013-02-09		LBINS016: Aclaración código registro num 1,6	CYC
2014-03-15	002	LBINS015: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
2014-03-15		LBINS016: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos	LFC

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

		de protección asociados a la técnica	
2014-10-11	003	LBINS015: Se realiza revisión del instructivo se actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	PAG
2014-10-11		LBINS016: Se realiza revisión del instructivo se actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	PAG
2015-08-03	004	Se crea el documento integrando los instructivos LBINS015 Instructivo Recuento Células Somáticas y LBINS016 instructivo Parcial de Orina, se define continuar el control de cambios a partir de la mayor versión que poseen los documentos que fueron integrados. Se incluye en el documento el histórico del control de cambios.	Carmen Yanira Chaparro – Quality Control
2017-06-28	005	Se modifica el nombre del procedimiento. Se agregan análisis de histopatología y Citopatología.	Carmen Yanira Chaparro – Quality Control
2021-03-02	006	Se actualiza todo el documento de acuerdo a la NTC-ISO/IEC 17025:2017. Se elimina el LBFMT030 Registro manual de microscopia y el LB – FMT – 032 Registro Manual de Patologías, Citologías. Se amplían las definiciones. Se incluyen gráficos para los diferentes tipos de análisis.	Jeanethe Rojas R. Gerente de Calidad.
2022-08-02	007	Se actualizan las referencias bibliográficas y las definiciones. Se actualiza el paso a paso del Uroanálisis. Se elimina el recuento de células somáticas, ya que esta prueba no se está realizando.	Laura Poveda Mendieta Directora Científica de Básicas.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido

El análisis proximal o también conocido como bromatológico completo, comprende la determinación de los porcentajes de proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, humedad, cenizas y el extracto libre de nitrógeno, siendo este un análisis básico pero completo que se realiza a los alimentos balanceados, granos, concentrados, forrajes, ensilajes, pastos y demás materias primas macros, que se utilizan en la formulación de los alimentos.

Este análisis permite determinar la cantidad mínima de nutrientes presentes en los alimentos y materias primas lo cual es esencial para calcular la ingesta de nutrientes de los animales y ajustar las dietas según sus requisitos específicos por especie y por etapa, así los productores pueden entender tanto las características nutricionales como las propiedades técnicas de un alimento y, por tanto, conocerán mejor cómo consumirlo, prepararlo, manipularlo y conservarlo, esto le permite al productor adquirir seguridad y confiabilidad en sus procesos, lo cual se traduce en una disminución en sus costos de operación.

La importancia que tiene el laboratorio en la evaluación de los nutrientes es que haciendo uso de las técnicas de análisis apropiadas y acreditadas podemos determinar la cantidad que requieren los animales de un determinado ingrediente, evita la compra de alimentos e insumos contaminados o adulterados y de esta manera hacemos que las empresas pecuarias sean rentables, por lo tanto, el análisis de alimentos es indispensable para establecer programas de alimentación que sean adecuados para los animales y para las empresas productoras.

Posiblemente usted como productor ganadero se ha preguntado cómo se desarrollan las diferentes pruebas bromatológicas a los pastos de su finca y de cómo estas pueden reflejar una situación determinada que permitirán tomar decisiones que vayan en beneficio de la alimentación de sus animales. El objetivo del presente artículo es aclararle y explicarle de manera sencilla cada uno de los pasos a los cuales se somete una muestra de pastos de su finca para extraerle la información que sirva de herramienta vital en las buenas prácticas en nutrición animal para que con ello usted pueda comprender de mejor manera las sugerencias de su zootecnista de confianza.

EL COMPONENTE FORRAJERO Como es natural, cada finca pecuaria se encuentra sometida a condiciones muy diferentes dentro de las cuales interactúan variables que no permiten generalizar el desempeño de una pastura simplemente por su especie. Entre ellas, se encuentran las condiciones del suelo donde ésta se desarrolla y del régimen de fertilización de la pastura. Asimismo, es vital el reconocimiento del tipo de explotación a la cual hace ha sometido la pastura directamente por parte de los animales (rotación) ó por acarreo y de su impacto sobre el desempeño nutricional de un forraje, sin olvidar las condiciones de altitud, el régimen de lluvias y los periodos de cosecha de los cortes. Es por ello que no es preciso tomar una decisión agronómica (fertilización del pasto ó manejo físico del suelo) ó nutricional (diseño de dietas) a partir de información genérica importada de otras fincas ó unidades productivas que no necesariamente reflejan la calidad del alimento que estamos produciendo y brindando a nuestros animales. Por ello surge el análisis bromatológico de pasturas, una herramienta básica para el diseño de dietas que utiliza el profesional en nutrición animal.

¿POR QUÉ SE CONOCE COMO ANÁLISIS BROMATOLÓGICO? Al tratar a las pasturas como un cultivo con requerimientos tan exigentes como cualquier otro producto vegetal, se comprende que es necesario el manejo técnico y profesional de las mismas. En este campo, la bromatología se conoce como la ciencia que estudia a los alimentos en cuanto a su producción, manipulación, conservación, elaboración y distribución, así como su

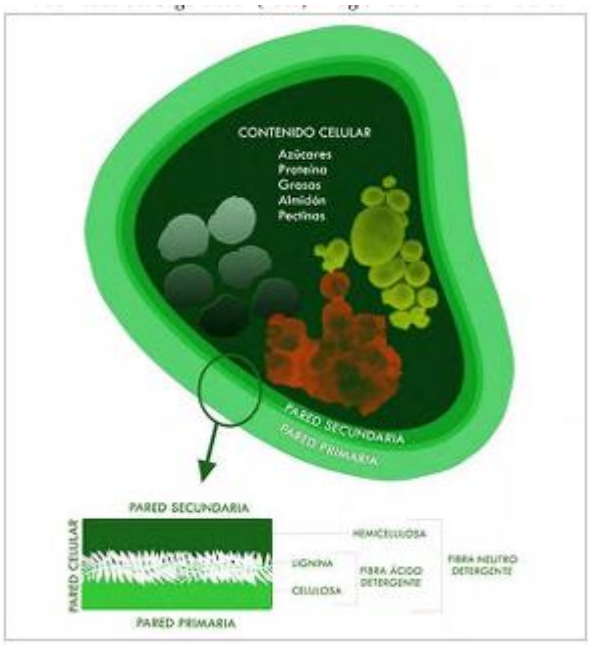
La información contenida en el presente procedimiento es propiedad del Laboratorio Clínico de Diagnóstico Zoolab SAS. Es SECRETA Y CONFIDENCIAL. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

relación con la sanidad. Ésta comprende la medición de las cantidades a suministrar a los individuos de acuerdo con los regímenes alimenticios específicos de cada tipo de animal. Con los forrajes, llevamos nuestro pasto al laboratorio para que a este se le separe en diferentes porciones y que cada porción nos indique cuanto obtenemos de cada componente de interés, llámese energía, proteína, fibras, etc.

LA CÉLULA VEGETAL DEL PASTO Para una mejor comprensión previo a explicar cada una de las pruebas de laboratorio que se efectúan al pasto, es necesario conocer que éste en su estructura básica, se encuentra formado por células vegetales que a su vez están compuestas por los alimentos que nos interesan, los cuales se encuentran almacenados para el aprovechamiento de la planta. Cada una de estas células tiene una pared celular que es el esqueleto de la célula y el sostén de la planta cuya función es la de proteger los tejidos y contenidos de la misma. Esta protección impide el máximo aprovechamiento de los contenidos de la pared celular por parte de los animales y representa un mecanismo de selección natural de la planta para sobrevivir a las variaciones de temperaturas, el cual se acentúa en el caso de las pasturas tropicales debido a que su pared celular se encuentra aún más protegida en gran parte por el compuesto conocido como lignina, que aporta impermeabilidad a la planta.

DISTRIBUCIÓN DE LOS COMPONENTES DEL PASTO DENTRO DE LA CÉLULA VEGETAL La morfología básica de las paredes celulares del pasto, así como del resto de plantas está determinada por la celulosa, la cual está formada por carbohidratos fuertemente unidos a los cuales, en el proceso de digestión Página 1 de 6 Sitio Argentino de Producción Animal animal, solamente tienen acceso las enzimas producidas por los microorganismos del rumen, quienes se alimentan de ella, permitiéndoles su rápida reproducción y crecimiento hasta representar un volumen importante y significativo de flora bacteriana conocida como la proteína microbiana, la cual es un aporte vital dentro de la dieta de los rumiantes. Estructuralmente, la célula posee dos paredes celulares; la primaria y la secundaria. La pared primaria está compuesta de fibrillas de celulosa, hemicelulosa y proteína con grandes cantidades de pectina que forman un armazón viscoso que consolida toda la pared. Todos estos componentes son responsables de la arquitectura de la planta y de la resistencia a los patógenos y enfermedades. A su vez, esta pared primaria está rodeada de una matriz compuesta igualmente de hemicelulosa, proteína y pectina. Las hemicelulosas son mezclas de carbohidratos digeribles (glucosas, manosas y galactosas, xilosas y arabinosas, entre otras) de diferentes polisacáridos (azúcares unidos repetidamente) y éstos se encuentran adheridos a la superficie de las microfibrillas de la celulosa. Por ser la hemicelulosa tan variada en sus tipos de carbohidratos y por sus características químicas, éstos son fácilmente solubles en agua y mucho más sensibles a la acción química que la celulosa, por lo tanto más digeribles. La lignina en la célula es heterogénea, amorfa y altamente ramificada y esta rodea las microfibrillas de la celulosa y de la hemicelulosa y es muy poco sensible al agua. La distribución de la lignina en la célula varía según el tipo de especie de pasto, la cual determina el tipo de lignina formada. Este compuesto es completamente indigerible y el conocer su cantidad en el pasto permite predecir la digestibilidad en materia seca y energía de un alimento debido a que, por encontrarse rodeando los carbohidratos mencionados anteriormente (hemicelulosa y celulosa), dificulta el acceso a los que sí son digeribles. A la celulosa y la hemicelulosa les corresponden los mayores porcentajes en la constitución de la fibra, seguidas de la lignina y las pectinas. Debido a esta composición tan compleja, es que se hace necesario contar con ensayos relativamente rápidos y confiables para determinar el contenido total de la fibra insoluble en los alimentos para animales.

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad del Laboratorio Clínico de Diagnóstico Zoolab SAS. Es SECRETA Y CONFIDENCIAL. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.



PROCEDIMIENTOS PARA EL ANÁLISIS DE PASTURAS Habiendo aclarado brevemente la composición interna del pasto, se comprende de mejor manera la importancia de cumplir ciertos niveles básicos desde el muestreo en campo hasta el laboratorio para llegar a los valores que necesitamos conocer de nuestras pasturas. Cada tipo de análisis químico a efectuar tiene como objetivo separar o aislar del ordenamiento natural de las plantas a sus fases fibrosas o nutricionales según el potencial químico que tenga cada reactivo de efectuarlo. Posterior a esto y con diferentes metodologías, se Página 2 de 6 Sitio Argentino de Producción Animal procede a cuantificar la cantidad del compuesto de interés y de manera porcentual, en relación a la totalidad del material analizado. Lo anterior al fin y al cabo expresa la calidad nutricional que posee la planta. EL MUESTREO La técnica de muestreo como parte inicial de un estudio integral de forrajes debe hacerse respetando los criterios de uniformidad y representatividad. En otras palabras, implica que el material que se lleve al laboratorio deberá ser una "fotografía" a muy pequeña escala del área que representa. Con esto, la precisión de datos permitirá explicar de manera técnica las verdaderas características y necesidades de cada cultivo. Existen diversas formas de muestreo de potreros dentro de las cuales pueden encontrarse algunas especializadas para las pasturas de piso como lo es el Botanal®, el cual es un método mixto que utiliza tanto técnicas de muestreo como de apreciación visual en la evaluación de la composición botánica y la producción de biomasa de las pasturas. Para cualquier muestreo juegan ciertos detalles a tomar en cuenta tal y como son el comportamiento alimenticio del animal sobre las pasturas; por ejemplo, en el caso de animales de pastoreo, se debe tomar muestras que asemejen la forma en que los animales comen en el campo. Otro ejemplo al respecto, sería si se quiere determinar la calidad del forraje que se destina a ensilaje de planta entera, silopacas o pacas para lo cual se debe muestrear cortando el material a la altura que cortaría la máquina para obtener mejores muestras. Independientemente de la técnica usada, el objetivo del muestreo es obtener correctamente el material para ser enviado al laboratorio.

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad del Laboratorio Clínico de Diagnóstico Zoolab SAS. Es SECRETA Y CONFIDENCIAL. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS Una vez que las muestras son colectadas en campo y llevadas al laboratorio de análisis de forrajes, se identifican con un código determinado que permitirá darle el seguimiento oportuno. Una vez concluido este paso la muestra lleva un proceso de secado y homogeneización para convertirla en la materia prima de todos los ensayos en el laboratorio.

DETERMINACIÓN DE LA MATERIA SECA A 60 Y 105 GRADOS CENTÍGRADOS Cada muestra llevada debe pasar por un tratamiento en el cual el pasto es convertido en harina donde, posterior a su pesaje en fresco, se coloca en un horno a una temperatura de 60 grados centígrados durante 48 horas. Es aquí donde el agua se evapora y el alimento seco restante se denomina materia seca a 60 grados centígrados. En este proceso, se llevó el forraje hasta una temperatura en la cual, si se hubiese mantenido por más tiempo dentro del horno, no hubiese perdido mayor cantidad de agua (ver figura 1). Lo anterior implica que, posterior a las 48 horas, por más que se mantenga el forraje dentro del horno, sin que varíe la temperatura, el contenido de agua no cambiará significativamente en el tiempo. El material es pesado una vez que esté seco lo cual permite determinar el porcentaje de materia seca con que se trabaja. El mismo procedimiento es repetido pero para una temperatura mayor, la cual provee el dato porcentual de materia seca a 105 grados centígrados. MOLIENDA Y ROTULACIÓN Cabe aclarar que hasta este proceso el material a analizar en general no ha cambiado sus cualidades nutricionales básicas y que su diferencia en relación al material fresco consiste únicamente en el cambio del contenido de agua y por supuesto, su apariencia física. En otras palabras, lo que se tiene es un "heno" muy seco, el cual debe ahora pasar por el proceso de ruptura de su estructura primaria (su forma de hoja y tallo) para ser literalmente molido con un equipo especializado que puede dar diferentes tamaños de partícula de harina, según el tipo de criba que se utilice y el análisis que se requiera. Este material molido representa la materia prima base para el trabajo del analista de laboratorio y es colocado posteriormente en recipientes de vidrio rotulados, en los cuales se conservarán por el tiempo necesario, cuidando que no entre en contacto con humedad que la dañe.

TIPOS DE ANÁLISIS REALIZADOS AL PASTO Cada unos de los componentes determinantes de la calidad de un forraje (proteína, tipos de fibras, carbohidratos, agua, cenizas etc.) que se utilizan como información básica para el diseño de una dieta, tienen características particulares que permiten identificarlas a través de métodos de laboratorio, por lo que se explican cada uno de estos de manera que puedan conocerse sus principios y comprender la importancia del cuidado que requiere una muestra dentro del periodo de análisis. A modo de ejemplo se explicará el procedimiento completo para el tratamiento de una muestra de pasto estrella (Cynodom nlemfluensis), proveniente de la zona de Cartago (Ochomogo) a la cual se le aplicará la técnica de análisis de fibra establecida por Goering y Van Soest (1980), así como también otros aspectos metodológicos básicos para determinar las cantidades de proteína, grasas y aceites que igualmente representan fracciones importantes del pasto. Página 3 de 6 Sitio Argentino de Producción Animal Ahora bien, la muestra está en su condición de materia seca (MS) a la espera de ser procesada y de obtener su información nutricional. A su vez, el material en estas condiciones está compuesto de una porción susceptible de quemarse porque está constituido por materiales que contienen carbón (substancias orgánicas) así como por sustancias que no se pueden quemar y que se mantienen como un residuo en forma de ceniza cuando se quema hasta la calcinación una muestra de materia seca. Este último procedimiento se realiza a 550 grados centígrados durante 24 horas y se conoce como Determinación de Cenizas. Una vez lista la muestra de pasto estrella para su uso por los equipos del laboratorio, se procede a efectuar la determinación del perfil de fibras. Dada la complejidad de la distribución de los componentes de la fibra de los pastos, de sus paredes así como de su composición química, cabe mencionar de previo que no existe ningún método completo o combinación de métodos que ofrezcan un análisis cuantitativo completo de todos los componentes de esta fracción fibrosa, mas bien ofrecen una

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad del Laboratorio Clínico de Diagnóstico Zoolab SAS. Es SECRETA Y CONFIDENCIAL. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

estimación bromatológica que a nivel general permiten evaluar la fibra del pasto de manera práctica para la toma de decisiones en la práctica nutricional.



EL PERFIL DE FIBRAS FIBRA NEUTRO DETERGENTE (FND) Para esta determinación, se toman pequeñas muestras (0.5 gramos) de la molienda del pasto, se coloca en una bolsa pequeña especial para estos procedimientos y se somete a la solución conocida como Solución Detergente Neutro (SDN) (Figura 3). Esta consta de una preparación previa de 5 reactivos a determinada concentración y con una acidez neutra. Esta solución es más débil en relación a la solución de la Fibra Ácido Detergente (FAD) y extrae en general los contenidos celulares de más fácil acceso en el pasto, dejando un remanente el cual se nombra como la Fibra Detergente Neutro, la cual está compuesta por hemicelulosa, celulosa y lignina. El proceso se realiza en máquinas diseñadas para tal fin las cuales mantienen el proceso en condiciones controladas aproximadamente durante una hora en la cual rompen, disuelven y extraen los diferentes tipos de azúcares dentro de la fracción fibrosa más débilmente adherida de la fibra del pasto. Página 4 de 6 Sitio Argentino de Producción Animal

FIBRA ÁCIDO DETERGENTE (FAD) Para esta determinación, se toma la anterior muestra extraída del proceso de solución detergente neutro (bolsa pequeña) y se somete nuevamente a reacción pero esta vez con la Solución Detergente Acida (SDA), la cual está compuesta de 2 reactivos que resultan en una solución de carácter ácido. El equipo utilizado y el tiempo empleado es el mismo que el procedimiento anterior. Al reaccionar la solución detergente ácida con la muestra de pasto, la hemicelulosa es liberada de la estructura

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad del Laboratorio Clínico de Diagnóstico Zoolab SAS. Es SECRETA Y CONFIDENCIAL. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

fibrosa, restando únicamente la Fibra Detergente Ácida (FDA), compuesta por celulosa y lignina aún adheridas entre sí. En resumen, la diferencia entre ambas soluciones (SAD Vs SND) radica en la capacidad de estas de disolver los compuestos contenidos en las fibras del forraje a través de la combinación de los reactivos específicos. LIGNINA La determinación de la lignina sigue el mismo principio que las reacciones mencionadas anteriormente solamente que el procedimiento es ligeramente diferente y se depende de un reactivo de muy alta concentración, el cual es ácido sulfúrico al 72%. Éste ácido al entrar en contacto con el contenido de la bolsa proveniente del proceso de Fibra Acido Detergente, toma la porción fibrosa más fuertemente adherida del pasto, la cual es la unión entre la lignina y la celulosa, rompiendo sus enlaces y liberando a la celulosa, por lo que a través de su pesaje detallado se obtiene el porcentaje de lignina de los pastos, el cual afecta directamente el grado de digestibilidad de un forraje y en general de las dietas para animales.

DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO ETÉREO Para determinar los lípidos ó compuestos grasos del pasto que nutricionalmente representan una fracción de alto valor energético, se agrega a la muestra de manera cuidadosa el reactivo conocido como éter anhidro hasta que éste se derrame en condiciones controladas. El éter anhidro tiene la capacidad de arrastrar estos compuestos de tal forma que los separa de la muestra de pasto. Los compuestos arrastrados por el éter tardan aproximadamente 4 horas en obtenerse de manera correcta. Una vez concluido el procedimiento se pesa lo obtenido y se calcula el porcentaje correspondiente a la muestra tratada.

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA Para esta prueba de proteína se toman muestras y se tratan a través de un procedimiento de determinación estandarizado desde hace muchos años conocido como Proceso Kjeldahl. El material es digerido con reactivos de alta capacidad los cuales liberan cada uno de los componentes elementales de la muestra, que en este caso, es el nitrógeno el que interesa valorar. Las proteínas están compuestas principalmente por el nitrógeno, el cual siendo contabilizado, permite a través de una sencilla conversión numérica, obtener el valor de proteína en los forrajes y en general de los compuestos orgánicos. A través de un método indirecto de valoración con soluciones que reaccionan al detectar diferencias entre los grados de acidez de las muestras, se determina el porcentaje de nitrógeno contenido, el cual permitirá conocer la composición proteica del pasto al multiplicarse por el factor 6,25. Cada uno de los procedimientos comentados requieren de una destreza comprobada departe de técnicos en bromatología laboratorial. En estos, el control y seguimiento de las muestras así como la preparación y ejecución de cada procedimiento recae una responsabilidad y cuidado que sumado al conocimiento en nutrición animal por parte del profesional zootecnista, permite la correcta interpretación de múltiples interacciones entre las diferentes fracciones de los componentes de una pastura, por lo que la labor detallada de un análisis de forrajes depende principalmente de la experiencia y de la pericia del profesional a cargo. Por ello es recomendable que el ganadero se asesore correctamente para efectuar prácticas alimenticias y agronómicas que vayan en beneficio de la fuente alimenticia de cada unidad productiva y de su rentabilidad.

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad del Laboratorio Clínico de Diagnóstico Zoolab SAS. Es SECRETA Y CONFIDENCIAL. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.



La información contenida en el presente procedimiento es propiedad del Laboratorio Clínico de Diagnóstico Zoolab SAS. Es SECRETA Y CONFIDENCIAL. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

1. INTRODUCCIÓN

En el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab se han implementado pruebas de identificación bacteriológica y micológica. Existe un amplio número de microorganismos que pueden generar infecciones en animales, sin embargo, se han adoptado los métodos adecuados a la infraestructura actual del laboratorio que permiten la identificación de microorganismos frecuentemente involucrados en cuadros clínicos animales, El método de identificación estándar se basa en la inoculación de una muestra sospechosa en medios de cultivo específicos y enriquecidos para el óptimo crecimiento del microorganismo.

2. PROPÓSITO

Unificar las actividades que se deben llevar a cabo para la realización de pruebas de bacteriología y micología en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.

3. ALCANCE

Aplica para la ejecución de los ensayos descritos en este POE, de acuerdo con el Numeral 7.2 - 7.2.1 Selección y Verificación de Métodos de la NTC-ISO/IEC 17025:2017.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Luna Fontalvo, J. A. (2020). Métodos analíticos de microbiología general y aplicada. Santa Marta, Editorial Unimagdalena.
- https://www.insumolab.cl/descargas/area_clinica/tubos/12x100/ficha_tecnica/15.pdf preparación de tolerancia 6.5.
- Calvino, L. y cols. Tratamiento de mastitis clínicas y manejo de antibióticos en el tambo. APROCAL, diciembre 23 de 2015.
- Manual de Procedimientos en Bacteriología Clínica. Biobacter. Sánchez, María Piedad. 2007.
- Manual de las Pruebas Diagnósticas para los Animales Terrestres. Capítulo 1.1.6. OIE Organización Mundial de Sanidad Animal, 2008.
- Manual de Laboratorio para la Identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo. OMS. Organización mundial de la salud 2004.
- Manual de procedimientos para el aislamiento y la identificación del *Campylobacter spp*. Instituto Nacional De Salud. Realpe María Elena. Julio de 2011.
- MANUAL DE PROCEDIMIENTOS CAMPYLOBACTER. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires, Argentina, 2001.
- Koneman, Diagnostico bacteriológico, texto y atlas a color, 6ed, Panamericana, Argentina, 2006.
- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bacteriología Teoría y Práctica. Editorial COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA 2013.
- Intructions for Use: Bruker Bacterial Test Standard. 2012
- Bruker Guide to MALDI sample preparation. 2012.
- Procedure for identification of yeast using MALDI-TOF. 2020

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

5. DEFINICIONES

- **AGAR-AGAR**: Polisacárido que se obtiene de algunas especies de algas y que la mayoría de los medios de cultivos sólidos contienen. La palabra “agar” es utilizada comúnmente para llamar a los medios de cultivos sólidos.

- **AISLAMIENTO:** Procedimiento mediante el cual se separan los microorganismos desde cualquier muestra o ambiente en un medio de cultivo, para obtener colonias puras.

- **ANTIBIOGRAMA:** Prueba que permite establecer la susceptibilidad bacteriana frente a antibióticos.

- **ANTIBIÓTICOS:** Sustancias producidas por algunas bacterias u hongos o fármacos sintéticos que inhiben el crecimiento de los microorganismos.

- **ASAS DE SIEMBRA:** Instrumento elaborado en una mezcla de metales (platino, acero, aluminio y cromo) que se emplea para transportar los inóculos y realizar las siembras de los microorganismos.

- **ASEPSIA:** Es la ausencia de microorganismos en ambientes, instrumentos de laboratorio y muestras biológicas. Esta se logra con un buen procedimiento de esterilización.

- **BATERÍA BIOQUÍMICA:** Es el conjunto de medios de cultivos o sustratos específicos que se emplean para la identificación bioquímica de las bacterias.

- **BTS**: Bacterial Test Standard.

- **CEPA:** Población de células genéticamente idénticas derivadas de una única célula. También se definen como el conjunto de especies bacterianas que comparten al menos una característica.

- **COLONIAS:** Conjunto de células microbianas formadas en la superficie de un medio de cultivo sólido. Las colonias presentan variaciones en aspectos de la morfología como los bordes, la elevación, la textura y la coloración.

- **COLORACIÓN:** Tinciones con diferentes colorantes que facilitan la visualización y diferenciación de los microorganismos observados al microscopio, esta permite ver características especiales de los mismos para así identificarlos y clasificarlos adecuadamente.

- **CONTAMINACIÓN**: Es la alteración de un cultivo microbiano puro por la presencia de otro microorganismo. También hace referencia a la presencia de microorganismos infecciosos en muestras de alimentos, medicamentos, agua para consumo y ambientes limpios.

- **CULTIVO AXÉNICO:** Es un cultivo conformado por una sola especie proveniente de una sola célula bacteriana. Se puede decir que un cultivo axénico es un cultivo puro.

- **CULTIVO MIXTO:** Es un cultivo conformado por dos o más células bacterianas de diferentes especies.

- **DESINFECCIÓN:** Es el procedimiento físico o químico mediante el cual se busca eliminar o inactivar los microorganismos presentes en un área, superficie, objeto o instrumento. La desinfección se logra con el

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

uso de sustancias químicas llamadas desinfectantes, como el alcohol antiséptico, solución de hipoclorito de sodio, peróxidos, yoduros, etc., que actúan de manera bacteriostática.

- **DILUCIONES SERIADAS**: Es un procedimiento mediante el cual se busca disminuir la concentración gradual de microorganismos presentes en una muestra. La dilución parte de un volumen conocido de la muestra (solución madre) y se lleva a un tubo de ensayo que contiene un volumen exacto de agua peptonada 0,1% o agua desionizada estéril, y a partir de este se lleva a otro tubo con igual volumen hasta donde se logre definir la concentración más baja o concentración deseada.

- **ESTERILIZACIÓN:** Es el proceso mediante el cual se matan o eliminan los microorganismos presentes en cualquier objeto o ambiente. La esterilización se realiza a través de mecanismos físicos como el tratamiento térmico con calor directo (fuego), calor húmedo (autoclaves) y calor seco (estufas); radiación (luz UV), filtración (filtros de 0,22-0,45 µm) y procedimientos químicos empleando reactivos como ácidos, alcoholes, aldehídos y fenoles.

- **ESPORA:** Estructura que se forma dentro o fuera de un microorganismo para sobrevivir durante un largo periodo de tiempo en el huésped causándole síntomas clínicos.

- **FERMENTACIÓN**: Es el proceso metabólico que realizan los microorganismos como bacterias y hongos en condiciones anaeróbicas. Consiste en transformar un compuesto orgánico, por ejemplo, un azúcar (glucosa), en otro compuesto orgánico, como ácidos orgánicos (ácido fórmico, cítrico, succínico, etc.), alcoholes (butanol, etanol, etc.) y gases (CO_2 y CH_4).

- **FLAGELO:** Es una estructura filamentosa que ayuda a la célula a desplazarse y moverme más rápido. Es una característica que solo comparten cierto grupo de microorganismos.

- **FLORA NORMAL:** Conjunto de microorganismos que pueden albergarse en un individuo sano sin cambiar su condición normal, pero cuando ocurre alguna alteración ya sea por causas endógenas o exógenas, aquellos microorganismos pueden desarrollar procesos infecciosos en cualquier ubicación anatómica del organismo que los hospeda, presentándose signos clínicos.

- **FLORA PATÓGENA:** Conjunto de microorganismos que habitualmente no se albergan en un individuo sano que generalmente causan procesos infecciosos en cualquier ubicación anatómica del organismo que los hospeda, presentándose signos clínicos.

- **HCCA:** ácido α-ciano-4-hidroxicinámico.

- **HOSPEDERO NORMAL:** Individuo que alberga un microorganismo sin detrimento para su salud.

- **HUESPED NORMAL:** Individuo que alberga un microorganismo sin detrimento para su salud.

- **INCUBACIÓN**: Se refiere al proceso mediante el cual los organismos o microorganismos crecen bajo condiciones controladas de temperatura. Por lo general, la incubación de los cultivos bacterianos en el laboratorio se realiza a una temperatura de 35-37 °C durante 24 horas.

- **INFECCIÓN**: Es la introducción y multiplicación de un microorganismo patógeno en un organismo

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

huésped al cual le genera un daño o trastorno. Las infecciones pueden ser locales o sistémicas, causadas por bacterias, hongos, virus y protozoos.

- **INÓCULO:** Suspensión de microorganismos presentes en una muestra biológica (tejidos, órganos, sustancias de secreción, etc.) o en muestras de alimentos, agua, suelos o ambientes. También se conoce como inóculo la pequeña cantidad de muestra que contiene los microorganismos que se depositan en un medio de cultivo o que son transferidos a un huésped**.**

- **MALDI-TOF:** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. Desorción/ionización láser asistida por matriz.

- **MEDIOS DE CULTIVO**: Son preparados sólidos, semisólidos o líquidos, estériles, que contienen todos los nutrientes necesarios y en la cantidad adecuada para el desarrollo de los microorganismos.

- **MEDIO DE TRANSPORTE:** Medio que mantiene la viabilidad de un microorganismo por un tiempo prologando para poder ser conservado hasta que este es cultivado en el laboratorio. Está conformado por un agar semisólido, buffer y sales.

- **PATÓGENO**: Agente biológico que tiene la capacidad de causar enfermedad o daño en un organismo huésped. Entre los microorganismos patógenos más agresivos se encuentran las bacterias, los virus y los hongos.

- **SENSIDISCOS**: Discos de papel que contienen un antibiótico de concentración conocida. Se emplean para determinar la sensibilidad o resistencia de un microorganismo frente a un antibiótico a través de técnicas semicuantitativas como los antibiogramas por difusión en agar por discos.

- **TINCIÓN:** Es la acción de teñir las células microbianas mediante la aplicación de sustancias químicas conocidas como colorantes. Según la cantidad de colorantes que se emplean, las tinciones pueden ser simples o compuestas. Buscan dar realce y definición a la forma y agrupación de las células.

- **TORUNDA**: Son bolitas de algodón que debido a su alta capacidad de absorción son idóneas, entre otras cosas, **para** la eliminación de sangre, secreciones, agua y suciedad de heridas.

- **SIEMBRAS MICROBIOLÓGICAS**: Procedimiento que consiste en introducir un inóculo en un medio de cultivo con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Las siembras se realizan con ayuda de un asa, a través de diferentes métodos como punción, estrías, extensión en superficie, etc.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

6.0 RECURSOS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS

6.1 EQUIPOS

- Cabina de seguridad biológica tipo IIA
- Incubadora (Rango de uso 36+/-1°C)
- Microscopio
- Autoclave
- Nevera (Rango de uso 2-8°C)
- Balanza analítica

6.2 INSUMOS

- Asas calibradas estériles
- Tubos de vidrio con tapa
- Cajas de Petri
- Hisopos estériles.
- Laminas porta objetos.
- Laminillas cubreobjetos
- Pinzas.
- Toallas desechables.
- Cinta de enmascarar
- Regla para lectura de antibiograma
- Erlenmeyer
- Probetas
- Asas Bacteriológicas
- Asas micológicas
- Vela
- Mechero
- Cámara de anaerobiosis

6.3 REACTIVOS

- **Medios de cultivo:**
- Agar Sangre.
- Agar Chocolate.
- Agar Sabouraud.
- Agar Mc Conkey
- Agar Mueller Hinton
- Caldo BHI.
- Agar Salmonela-Shiguella.
- Agar tetrationato.

Reactivos:

- Glicina

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Cloruro de sodio.
- Agua destilada o desionizada.
- Solución violeta de Gram
- Solución Lugol de Gram.
- Solución alcohol acetona de Gram
- Solución fucsina de Gram.
- Aceite de inmersión.
- Azul de lactofenol.
- Solución salina estéril en tubos.
- Plasma sanguíneo con EDTA
- Kits comerciales de pruebas bioquímicas para identificación bacteriana
- Agua oxigenada
- Pruebas de oxidasa

Sensidiscos de antibióticos:

- Ácido nalidíxico.
- Aminoglucósidos
- Betalactámicos
- Quinolonas
- Cefalosporinas (generaciones 1,2 y 3)
- Macrólidos.

6.4 MATERIAL DE REFERENCIA

- Cepas bacteriológicas de referencia (Gram positivo y Gram negativo).

6.5 ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL:

- Careta
- Guantes de látex
- Tapabocas
- Zapato blanco
- Uniforme
- Gorro
- Bata blanca

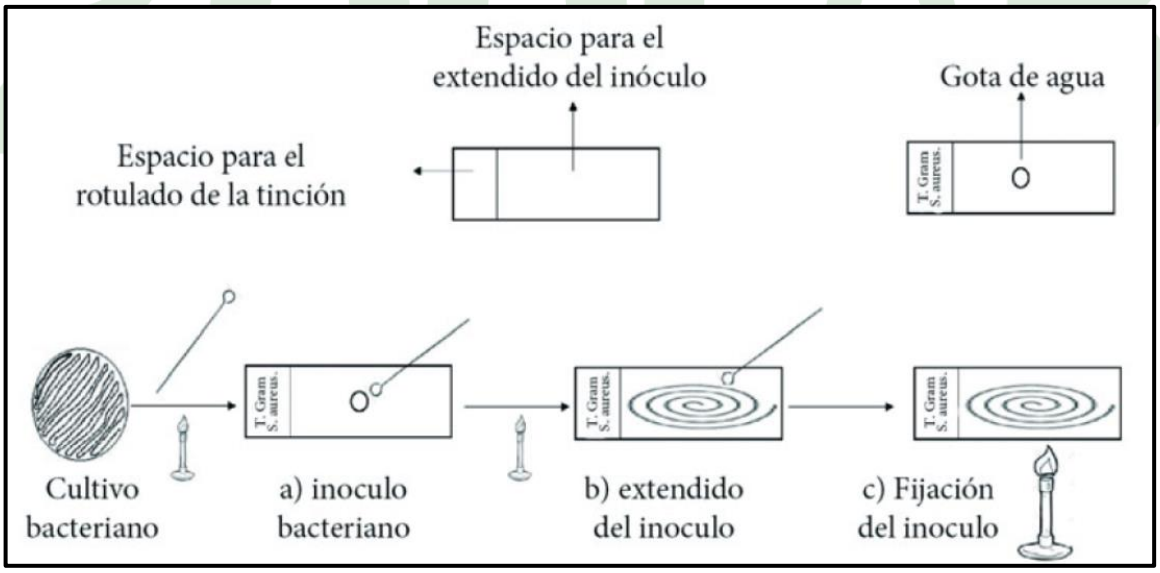
La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

7 MORFOLOGÍA BACTERIANA Y TINCIONES

Las bacterias son microorganismos incoloros y pequeños, por tal razón, sólo es posible observarlos mediante un examen microscópico. cuando se requiere conocer a detalle su morfología, es necesario recurrir a los reactivos necesarios para que sean fijadas y teñidas. Estas tinciones ofrecen algunas ventajas como, por ejemplo: aumentan el contraste entre la célula bacteriana y el medio que la rodea, permiten distinguir diferentes tipos de células bacterianas según sea su capacidad de teñirse con cualquier colorante y permiten establecer la morfología de la célula bacteriana y de otros microorganismos, su agrupación y también algunas estructuras específicas. Este tipo de preparaciones se basa en los siguientes procedimientos:

EXTENSIÓN: Consiste en depositar asépticamente, en el centro de un portaobjeto, una gota de solución salina y, con ayuda del asa de siembra, extraer el inóculo desde un cultivo bacteriano, luego se procede a expandir el inóculo junto con la gota de agua sobre la superficie del portaobjeto de manera uniforme.

FIJACIÓN: Después de extendidas, las bacterias se deben adherir al portaobjeto en el cual se van a teñir; la fijación por calor es lo más común (método físico a través de la llama del mechero para inducir la muerte celular y adherirlas al portaobjeto), pero también se recurre a compuestos químicos como formaldehído y alcoholes (método químico).



Procedimiento para la obtención y fijación de un frotis bacteriano.

TINCIÓN: Una vez fijada la muestra, se hace uso de los colorantes, la mayoría de ellos son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los componentes celulares.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Las tinciones pueden ser:

- **Simples:** Utilizan un solo colorante. Se basan en el hecho de que la célula tiene una composición química diferente a la de su entorno, por ende, ambos se comportan de manera distinta frente a un colorante.

- **Compuestas o Diferenciales**: Son capaces de diferenciar estructuras o incluso microorganismos que poseen características superficiales específicas y, por lo tanto, reaccionan diferente frente a una tinción, por ejemplo, la tinción de Gram y la tinción de Ziehl Neelsen.

Los colorantes pueden ser de distintos tipos:

- Catiónicos o Básicos: Son aquellos que tienen cargas positivas y se combinan fuertemente con los componentes celulares cargados negativamente, como lo son los ácidos nucleicos, polisacáridos ácidos, y la mayoría de las superficies celulares como, por ejemplo: el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina.

- Aniónicos o Ácidos: Son aquellos que poseen carga negativa, no penetran el interior celular, solo tienen la capacidad de teñir su entorno, como, por ejemplo: la eosina.

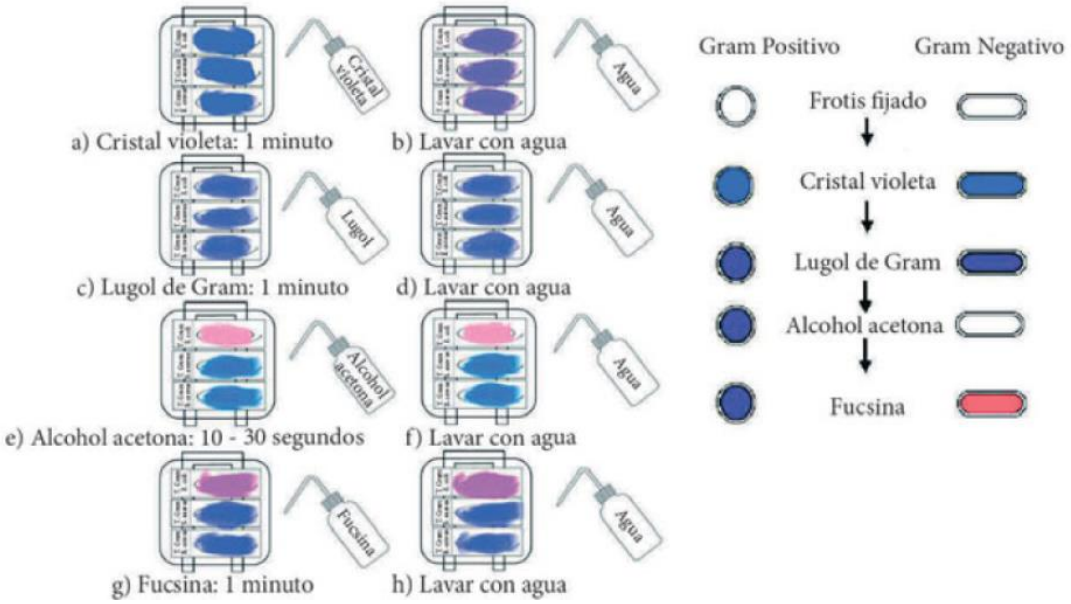
- Liposolubles: Se mezclan con los lípidos celulares y los tiñen, por ejemplo: Negro Sudán (diferenciación de leucemias)

7.1 TINCIÓN DE GRAM

Es un tipo de tinción especial usada para la diferenciación de morfología bacteriana. Se utilizan 4 colorantes que tienen afinidad a la pared bacteriana. El **cristal violeta** es el primer colorante utilizado, tiene afinidad por el peptidoglicano y teñirá de morado todas las bacterias presentes, posteriormente se coloca el **Lugol** que inducirá la formación de complejos insolubles de cristal violeta-yodo-proteínas ribonucleares dentro de la célula. Las bacterias Gram positivas, al tener una pared gruesa de peptidoglicano, forman más complejos (cristal violeta-yodo), por tanto, retienen el colorante. Además, también influye que la pared de las bacterias Gram positivas contienen mayor cantidad de ácidos no saturados, los cuales muestran gran afinidad por los agentes oxidantes (Lugol).

Por el contrario, las bacterias Gram negativas, poseen una capa delgada de peptidoglicano, lo que hace que formen menos complejos. Posteriormente se realiza la decoloración, donde las bacterias Gram positivas y Gram negativas se comportan de manera diferente. Las bacterias Gram negativas contienen una membrana externa rica en lipopolisacáridos (LPS), que forma parte de su pared celular. Las grasas son destruidas por el contacto con el **alcohol acetona**, por lo que la membrana externa se desestabiliza, siendo liberado el cristal violeta. Es así como luego es contra teñida con la **safranina o fucsina básica**, tomando el color fucsia. En el caso de las bacterias Gram positivas, resisten la decoloración porque el decolorante actúa cerrando los poros, lo que impide que el complejo cristal violeta/yodo pueda salirse. Por lo tanto, se mantiene estable la coloración con el cristal violeta, y no hay cabida para la safranina o la fucsina. Por esto, se tiñen de azul intenso o morado.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



Pasos para la realización de una Tinción de Gram.

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Fluidos, secreciones, excreciones de cualquier especie animal.	~~Determinación~~ Identificación de ~~gérmenes~~ bacterias Gram Positivas y/o ~~gérmenes~~ Gram Negativas en muestras biológicas de fluidos, secreciones, excreciones. Extendido y Tinción	Coloración de Gram.	Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas.	20 minutos.

Nota: **NO OLVIDE MARCAR LAS LÁMINAS PORTAOBJETOS QUE UTILICE DURANTE LA PRUEBA**

- Revisión e identificación de la muestra con el número correspondiente
- Realizar el extendido sobre una lámina portaobjetos de la secreción y/o cultivo.
- Fijar el extendido con el mechero.
- Cubrir la lámina por 60 segundos con Cristal Violeta.
- Eliminar el exceso de colorante y lavar rápidamente con agua, manteniendo el portaobjeto en posición inclinada.
- Cubrir la lámina por 60 segundos con Lugol de Gram.
- Lavar nuevamente con agua.
- Cubrir la lámina por 30 segundos con Alcohol - Acetona de Gram.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Lavar con agua.
- Cubrir la lámina por 60 segundos con Fucsina de Gram.
- Lavar con agua, secar y observar a inmersión (100X).
- Consignar lo observado en el LBFMT031 Registro de Microbiología.

CONTROL DE CALIDAD DE COLORANTES

Por cada reactivo nuevo, debe realizarse un control del lote, con la cepa de control microbiológico según el procedimiento de la tinción mencionada anteriormente y el resultado debe registrarse en LBFMT090 control de colorantes.

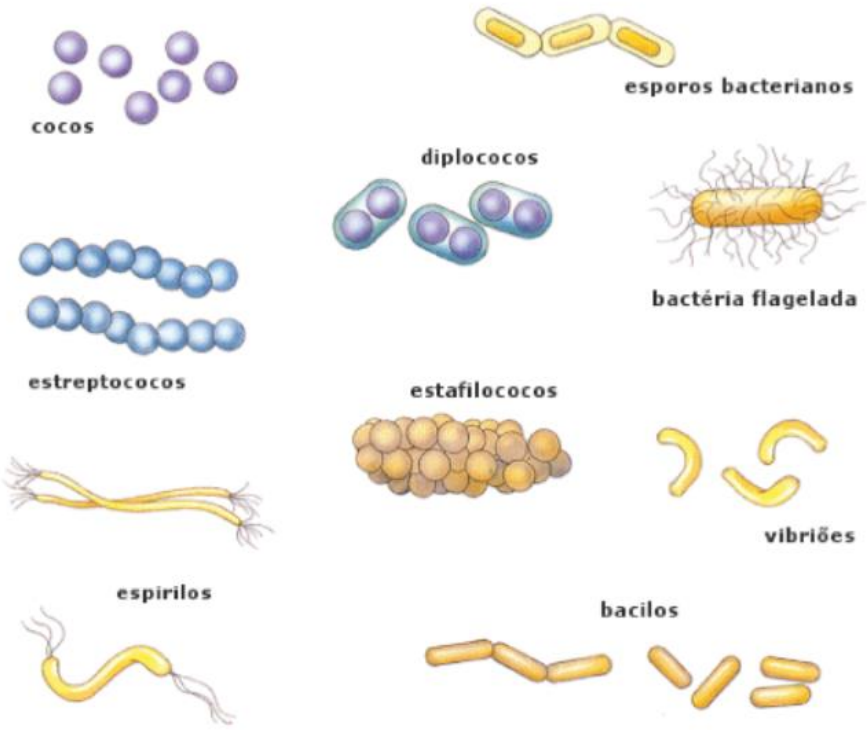
MORFOLOGÍA BACTERIANA

Con la visualización de las bacterias utilizando tinciones especiales se puede obtener información importante que puede ser utilizada en la identificación de una bacteria. Se puede determinar la morfología microscópica definiendo la forma, el tamaño y modo de agrupación de las mismas.

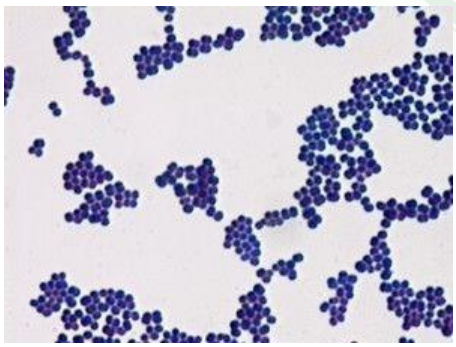
Las bacterias tienen principalmente tres formas: esféricas (cocos); cilíndricas o en forma de bastón (bacilos) y en espiral o helicoidal (espirilos).

- **COCOS**: Son bacterias esféricas que presentan diferentes tipos de agrupaciones, éstas dependen de la división celular. Cada agrupación es propia de distintos géneros, por lo cual, es útil para la identificación, aunque no definitiva por lo cual es necesario realizar pruebas bioquímicas específicas para la determinación del género y la especie. Por ejemplo, Neisseria spp. está conformada por parejas de cocos en cadenas; Streptococcus spp. está conformado por cocos en cadenas; Staphylococcus spp. está conformado por racimos.
- **BACILOS**: Son bacterias en forma de bastones, varían según su tamaño, longitud y diámetro, no suelen presentar agrupaciones, sin embargo, se pueden observar en cadena o en pares.
- **ESPIRILOS:** Son bacterias con morfología helicoidal o en espiral, éstas predominan como células aisladas o individuales.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

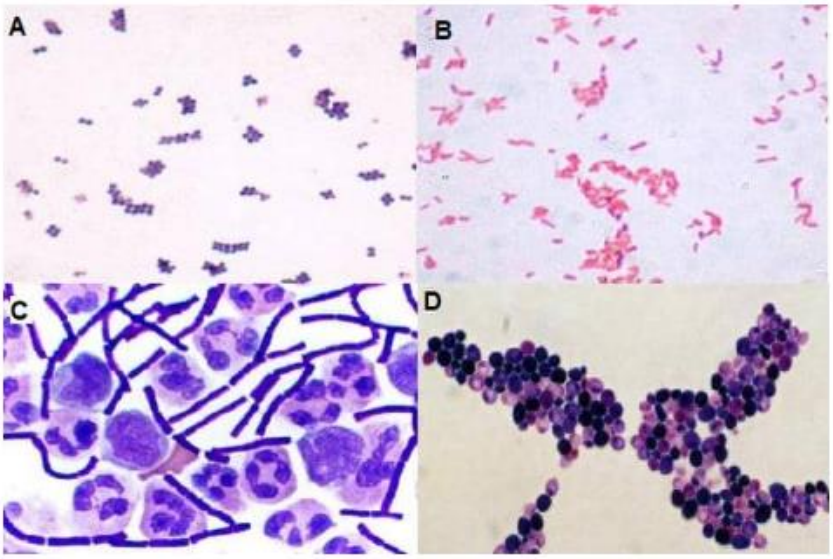


Morfología y agrupación bacteriana.

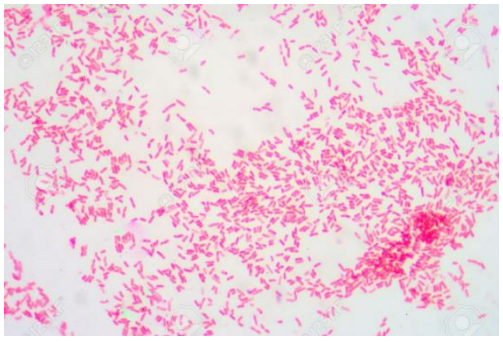




La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



Diversos extendidos teñidos con tinción de Gram. A. Cocos Gram positivos. B. Bacilos Gram negativos. C. Bacilos Gram Positivos, polimorfonucleares y mononucleares. D. Levaduras.





La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

8 MEDIOS DE CULTIVO

Las bacterias necesitan nutrientes apropiados junto con condiciones ambientales favorables para un óptimo crecimiento. Existen y se utilizan una gran variedad de medios de cultivo cuya composición varía de acuerdo con las necesidades nutricionales de los organismos que se pretende estudiar. Así, el trabajo de aislamiento en cultivo puro de una especie dada puede facilitarse con ayuda de medios de cultivos que aprovechan alguna característica particular para sus exigencias nutricionales, aparte de considerar otros requerimientos como la temperatura, grado de humedad, el oxígeno, el pH, etc. (Gómez y Batista, 2006). Los medios de cultivos se definen como cualquier preparado, sólido o líquido, que contiene todas las sustancias nutritivas para el desarrollo de las bacterias. Este debe ser estéril y estar protegido de la contaminación ambiental (Valenzuela, 2007).

8.1 CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se han clasificado de acuerdo a su estado físico y utilización.

Según su estado físico:

MEDIOS LÍQUIDOS: Comúnmente llamados caldos, se emplean para la homogenización de muestras, realizar diluciones y enriquecimiento del medio de cultivo. Así mismo, son útiles para la activación de cepas microbianas liofilizadas. Por lo general, estos medios suelen servirse en tubos de ensayos. Ejemplos: caldo tetrationato (recuperación de *Salmonella sp*.), caldo tioglicolato (bacterias anaerobias) y caldo infusión cerebro corazón (BHI).

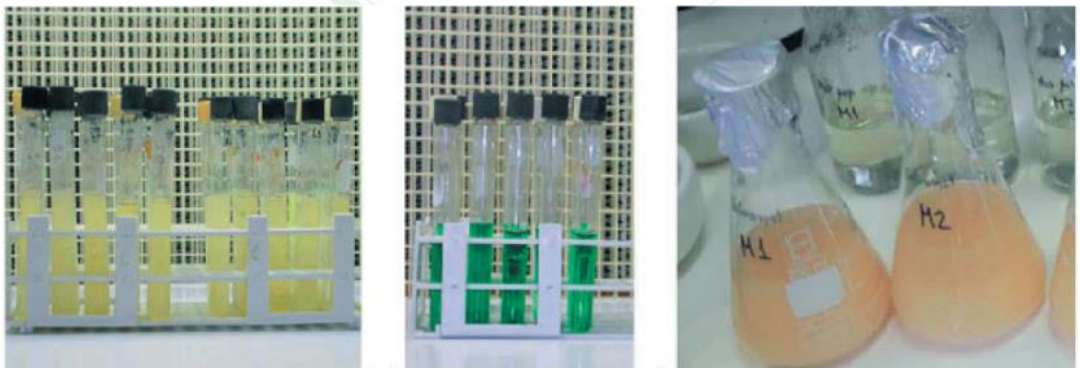


Imagen 4: Medios de cultivo líquido.

MEDIOS SÓLIDOS: Se conocen como agares. Se obtienen a partir de medios de cultivos líquidos a los cuales se les agrega una sustancia solidificante, como por ejemplo agar-agar, gelatina o gel de sílice (los agares no

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

deben confundirse con el agar-agar; este último es solo un agente solidificante y no brinda condiciones nutricionales). Los agares son empleados frecuentemente en placas de Petri o en tubos de ensayos de manera inclinada, y son útiles para el aislamiento de bacterias a través del desarrollo de colonias y mantenimiento de cultivos puros. Ejemplo: agar Sangre, agar Chocolate, agar Sabouraud, agar Mc Conkey, agar Müller-Hinton, agar *Salmonella – Shigella* (SS).

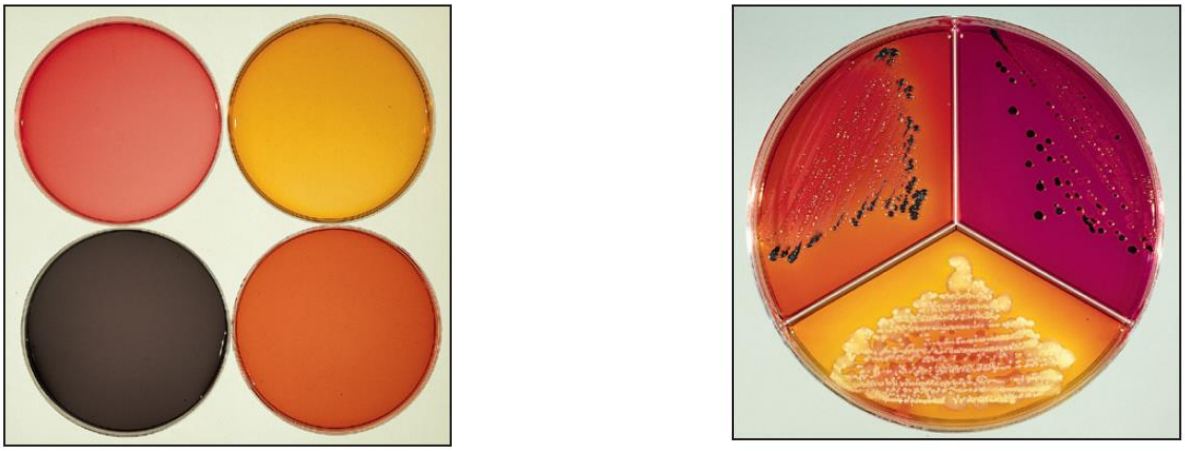


Imagen 5: Medios de cultivo sólidos

Según su utilización:

- **Medios Enriquecidos**: Son medios de cultivos comunes a los que se les agregan ciertos ingredientes que enriquecen su condición nutritiva original. Se emplean para el aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes, por ejemplo: agar sangre, que está constituido de agar peptona más 5% de sangre desfibrinada; el caldo glucosado, que es caldo de peptona enriquecido con 1% de glucosa.

- **Medios Selectivos**: Son aquellos medios que han sido formulados químicamente de tal forma que favorecen el crecimiento de la especie que se desea aislar y al mismo tiempo suprimen el de cualquier otra especie competidora. Se preparan incluyendo generalmente algunas sustancias inhibidoras como antibióticos, sales biliares, etc., por ejemplo: agar *Salmonella – Shigella* (SS).

- **Medios Diferenciales**: Son aquellos que favorecen el aislamiento de una especie dada a partir de un cultivo mixto, permitiendo reconocerla o detectarla a través de una característica bioquímica de valor taxonómico que le es propia: por ejemplo, la hemólisis de glóbulos rojos (en agar sangre), la coagulación del plasma, la fermentación de azúcares a través de cambios de pH que se detectan en el medio (que contienen un indicador de pH adecuado, como azul de bromo timol, rojo fenol, entre otros.

8.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- **No olvide marcar todos los recipientes que utilice durante la prueba.**

- Seguir las instrucciones consignadas en cada recipiente de medio de cultivo, de acuerdo con la casa comercial fabricante como se muestra en la Tabla 1.

MEDIO	CANTIDAD A PREPARAR	GRAMOS DEL MEDIO	ADICION SUPLEMENTO	ESTERILIZACIÓN	ESPECIFICACIONES
Agar Sangre y Chocolate	100 ml (5 cajas) 200 ml (10 cajas) 300 ml (15 cajas) 400 ml (20 cajas) 500 ml (25 cajas)	4 gr 8 gr 12 gr 16 gr 20 gr	5 ml sangre desfibrinada 10 ml sangre desfibrinada 15 ml sangre desfibrinada 20 ml sangre desfibrinada 25 ml sangre desfibrinada	SI (15 Min.) 121°C	Agar Sangre: Dejar enfriar el medio y agregar la sangre. Agar Chocolate: Adicionar la sangre inmediatamente el medio sale del autoclave
Agar Mc Conkey	100 ml (5 cajas) 200 ml (10 cajas) 300 ml (15 cajas) 400 ml (20 cajas) 500 ml (25 cajas)	5,15 gr 10,3 gr 15,45 gr 20,6 gr 25,75 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	51,5 gr en 1Litro
Müller-Hinton	100 ml (5 cajas) 200 ml (10 cajas) 300 ml (15 cajas)	3,8 gr 7,6 gr 11,4 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	38 gr en 1Litro
Agar Sabouraud	100 ml (5 cajas) 200 ml (10 cajas) 300 ml (15 cajas)	6,5 gr 13 gr 19,5 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	65 gr en 1Litro
Agar Salmonella - Shigella	100 ml (5 cajas) 200 ml (10 cajas) 300 ml (15 cajas)	6 gr 12 gr 18 gr	NO	NO. LLEVAR A EBULLICIÓN Y SERVIR.	60 gr en 1 Litro
Caldo BHI	100 ml (10 tubos) 200 ml (20 tubos) 300 ml (30 tubos) 400 ml (40 tubos) 500 ml (50 tubos)	3,7 gr 7,4 gr 11,1 gr 14,8 gr 18,5 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	37 gr en 1 Litro
Caldo Tetrationato	100 ml (10 tubos) 200 ml (20 tubos) 300 ml (30 tubos) 400 ml (40 tubos) 500 ml (50 tubos)	4,6 gr 9,2 gr 13,8 gr 18,4 gr 23 gr	NO	NO. LLEVAR A EBULLICIÓN, ENFRIAR (45°C) ADICIONAR EL SUPLEMENTO Y SERVIR.	46 gr en 1 Litro
Caldo Tioglicolato	100 ml (10 tubos) 200 ml (20 tubos) 300 ml (30 tubos) 400 ml (40 tubos) 500 ml (50 tubos)	2,9 gr 5,8 gr 8,7 gr 11,6 gr 14,5 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	29 gr en litro
Agar semisolido NaCl 6,5%	100 ml (10 tubos) 200 ml (20 tubos)	2,5 gr BHI - NaCl 6,5 gr - Agar 1,5 gr. 5 gr BHI - NaCl 13 gr - Agar 3 gr	NO	SI (15 Min.) 121°C	BHI 25 gr en litro Cloruro de sodio 65 gr en litro Agar 15 gr en litro

Tabla 1: Preparación de medios de cultivo.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Todos los agares deben ser hervidos antes de esterilizarse y que una vez esterilizados deben dispensarse rápidamente en las cajas de Petri.

- **AGAR SANGRE:** Una vez esterilizado el medio esperar a que alcance temperatura de 45°C y agregar sangre de cordero al 5%, homogenizar y servir inmediatamente.

- **AGAR CHOCOLATE**: una vez esterilizado esperar a que el medio alcance temperatura de 80°C y agregar sangre de cordero al 5%, homogenizar y servir inmediatamente.

- **AGAR PRUEBAS DE MOTILIDAD**: Se prepara con los siguientes reactivos: BHI CALDO (37g), agua destilada (1l), agar agar (4g), ajustar el pH a 7,4+/- 0,2. Esterilizar y servir, finalmente asignar lote.

- Cada vez que se preparen medios de cultivo debe asignarse un lote para cada medio preparado de la siguiente manera: diligenciarse el registro de lote y control de medios de cultivo LB-FMT 039.

  Para asignar el lote, las letras iniciales de los medios de cultivo son:

  - ✓ Agar Sangre (A-S).
  - ✓ Agar Chocolate (A-Ch).
  - ✓ Agar Sabouraud (A-Sb).
  - ✓ Agar Mc Conkey (A-McC).
  - ✓ Agar Mueller Hinton (A-MH).
  - ✓ Caldo BHI (C-BHI).
  - ✓ Ellinghausen - McCullough – Johnson – Harris (EMJH)
  - ✓ Agar Sal*monela-Shiguella* (A-SS).
  - ✓ Agar motilidad (A-M).

- Además de las iniciales, se agrega la fecha de preparación. (AAMMDD).

- Registrar el control de preparación de medios y el lote en el formato LBFMT039 (Lote y Control de medios de cultivo).

8.3 CONTROL DE CALIDAD- PRUEBA DE ESTERILIDAD

Por cada lote preparado se incubará una muestra de éste a 36-38°C por 24 horas. Esto con el fin de confirmar esterilidad del medio y se espera que no exista crecimiento alguno, de no ser así todo el lote debe ser eliminado.

8.4 CONTROL DE CALIDAD- PRUEBA DE FUNCIONAMIENTO

Por cada lote preparado se debe realizar la siembra de cepas de referencia disponibles. Se tiene que evidenciar crecimiento en los medios pertinentes, de no ser así todo el lote debe ser eliminado.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

8.5 AMBIENTES DE CULTIVO

Cada cepa o especie bacteriana tiene temperatura óptima de crecimiento y concentraciones de oxígeno requeridas para su desarrollo. En el laboratorio se pueden utilizar para el aislamiento primario de los microorganismos:

8.5.1 AEROBIOSIS

Consiste en tener presencia de oxígeno (21 %), nitrógeno (78 %), y otras sustancias (1 %), como ozono, dióxido de carbono, hidrógeno y gases nobles (como kriptón y argón). Este ambiente se logra con el oxígeno ambiental, es decir la incubación se realiza colocando las placas en posición invertida en la incubadora.



Imagen 6: Incubadora.

8.5.2 MICROAEROFILIA

Consiste en tener un ambiente con disminución en la cantidad de oxígeno. Se puede lograr a través de los siguientes métodos:

Jarra con vela: Para esto se introducen los medios de cultivo inoculados dentro de una campana, se enciende una vela dentro de la campana y se cierra la tapa, vigilar hasta que se apague la vela. La combustión de la vela aporta una atmósfera aproximada de 17-19% de oxígeno y de 2-4% de dióxido de carbono.

Generadores caseros: reduce la atmósfera de oxígeno por consumo en reacción química y aumenta la de dióxido de carbono por medio de la disolución de bicarbonato en agua. Entre estos tenemos: una pastilla de boranato de sodio (0,8 gr para una jarra de 3 litros), una pastilla de Alka Seltzer en 10 ml de agua destilada. Introducir los componentes mencionados dentro de una campana junto con los cultivos inoculados. Cerrar la campana.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

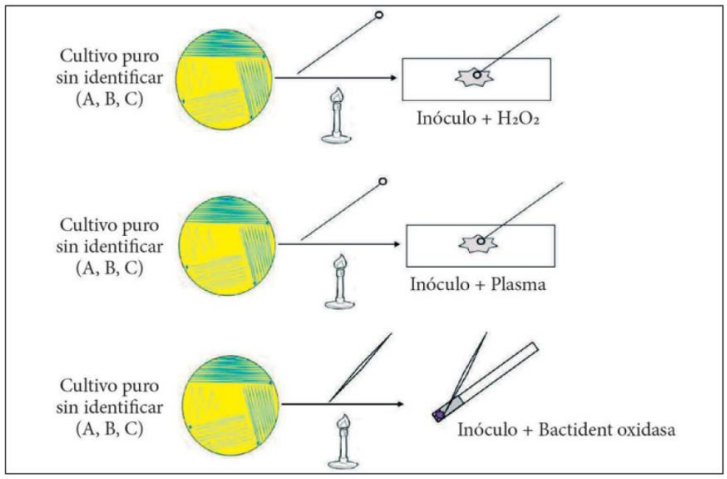
Sobres comerciales para microaerofilia: Introducir los sobres dentro de una campana junto con los cultivos inoculados.



Imagen 7: Cámara de microaerofilia.

9. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN

enzimáticas. a) Catalasa, b) Coagulasa, c) Oxidasa.



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Son una serie de análisis que sirven para determinar los procesos metabólicos de una cepa pura de microorganismo y así poder identificar familia y especie de este. Estas se realizan en diferentes medios de cultivo, los cuales son selectivos y tienen indicadores que permiten determinar la reacción bioquímica.

COCOS GRAMPOSITIVOS (*Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus*).

Crecen en medios de enriquecimiento como el agar sangre en donde se observan diferentes colonias:

Staphylococcus aureus: Son cocos Gram positivos, las pruebas de catalasa y coagulasa son positivas. Se identifican porque sus colonias tienen un tamaño aproximado de 2 a 3 mm, son lisas, amarillas con presencia de beta hemolisis y se agrupan en racimos. En el caso de los aislados que son positivos a la coagulasa, esta suele observarse por la técnica de lámina donde se evidencia un precipitado granular o formación de grumos blancos a los 15 o 20 segundos, si estos se presentan después de los 2 minutos, la prueba se considera negativa.

Otros *Staphylococcus* no hemolíticos: son cocos Gram positivos, las pruebas de catalasa positiva y coagulasa negativas. Se identifican porque sus colonias tienen un tamaño aproximado de 1 a 2 mm, son lisas de color blanco y no presentan hemolisis, se agrupan en racimos.

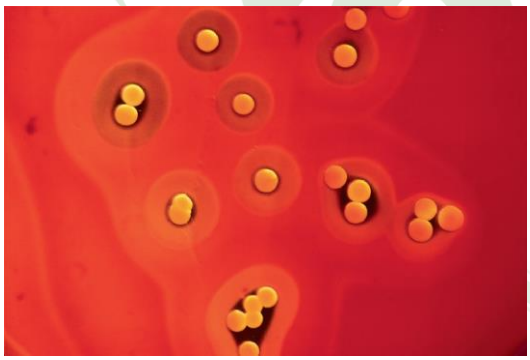
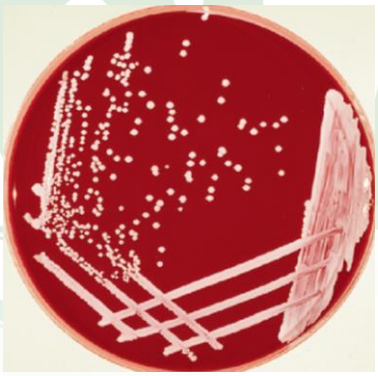
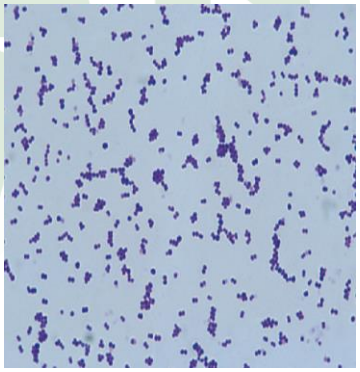
 Colonias de *S. aureus* en agar sangre	 *S. hyicus* en agar Sangre.	 *S. aureus* en tinción de gram.

Tabla 2: Características morfológicas de *Staphylococcus*.

Catalasa: Es una enzima que desdobla el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. El H_2O_2 es el producto final del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono (azúcar); la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas son catalasa +. Esta prueba permite le diferenciación entre *Staphylococcus* y *Streptococcus.*

- ✓ Técnica en lámina: Agregar en la lámina portaobjetos 1 o 2 gotas de H_2O_2, tomar una colonia con un asa previamente esterilizada y mezclarla. La prueba se interpretará como positiva si aparecen

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

instantáneamente y de manera continua burbujas o efervescencia.



Coagulasa: Es una enzima proteolítica capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible. Esta prueba permite le diferenciación entre *Staphylococcus aureus* – *S.pseudintermedius* de los *Staphylococcus* no hemolíticos. Existen 2 formas de realizarla:

- Coagulasa fija: Factor de coagulación unido a la pared de la bacteria y se detecta mediante prueba de lámina.
- Coagulasa libre: Se encuentra presente en los filtrados de cultivo y se detecta mediante prueba en el tubo.

✓ Técnica en lámina: Colocar una gota de solución salina fisiológica (SSF) y suspender en ésta una colonia con el asa bacteriológica estéril, mezclar bien y agregar una gota de plasma **no suero**. La prueba se interpretará con la aparición precipitados granulares o formación de grumos blandos de 15 a 20 segundos indicando que la prueba es positiva. Si se observa aglutinación después de los 2 minutos, la prueba se considera negativa.

✓

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

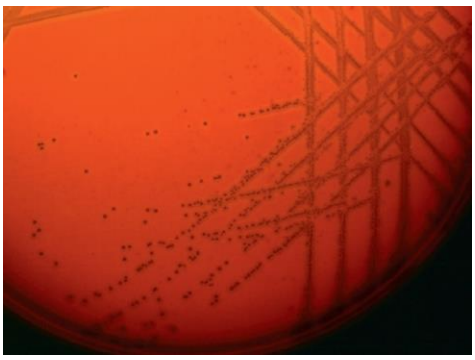


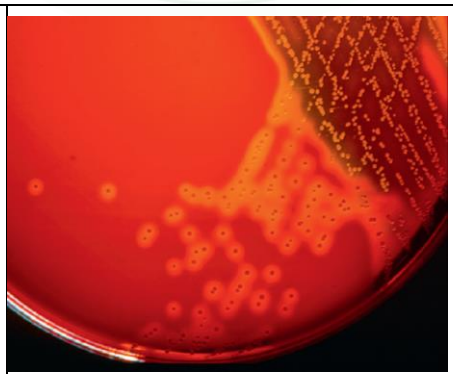
Streptococcus* y *Enterococcus: Los estreptococos y enterococos son cocos Gram positivos que se presentan solos, en parejas o en cadenas de longitudes variables. Cada coco tiene menos de 2 µm de diámetro y puede tener un aspecto esférico u ovoide. Son anaerobios facultativos, catalasa-negativos, oxidasa-negativos y no móviles con la excepción de algunos enterococos.

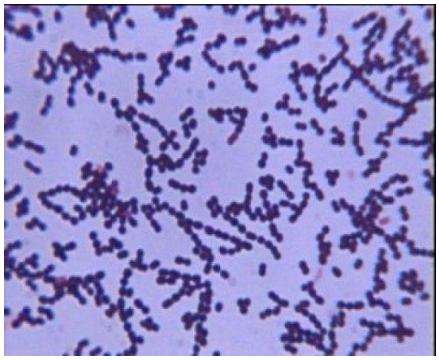
Los estreptococos son muy exigentes y requieren la adición de sangre o suero a los medios para crecer. Los enterococos toleran las sales biliares en el agar McConkey y aparecen como pequeñas colonias puntiformes en este medio. El tipo de hemólisis producido por una especie de estreptococo puede ser variable. Los principales tipos de hemólisis son:

- (β) Hemólisis beta: una zona clara de hemólisis alrededor de la colonia.
- (α) Hemólisis alfa: una zona de color verdoso o de hemólisis parcial.
- (γ) Hemólisis gamma: no hay hemólisis.

En general, los estreptococos beta-hemolíticos suelen ser los más patógenos en medicina veterinaria.


Colonias de *Streptococcus* en agar sangre. (Alfa hemólisis).


Colonias de *Streptococcus* en agar sangre. (Beta hemólisis).


Streptococcus en tinción de gram.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Tabla 3: Características morfológicas de *Streptococcus*.

Tolerancia al NaCl al 6.5 %: Sirven para la diferenciación entre *Streptococcus* y *Enterococcus* los cuales crecen en medios con alto contenido salino.

- ✓ Técnica: Inocular en el tubo con el NaCl el microorganismo, incubar a 37°c por 24 a 48 horas. La interpretación se realiza con la presencia de turbidez por el crecimiento bacteriano.
- ✓

COCOS GRAMNEGATIVOS (Neisseria sp. y Moraxella sp).

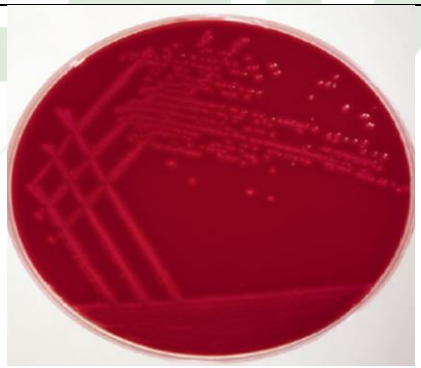
Crecen en medios de enriquecimiento como el agar sangre y chocolate; las pruebas de catalasa y oxidasa son positivas.

***Neisseria sp*:** Se identifican porque sus colonias son pequeñas con bordes circulares, translucidas y brillantes, de coloración gris, sin presencia de hemolisis y se agrupan en diplococos.

***Moraxella sp*:** Se identifican porque sus colonias son planas, redondas pequeñas de color blanco-grisáceo y en las principales especies que afectan animales están rodeadas de una estrecha zona de hemolisis; se agrupan en diplococos.

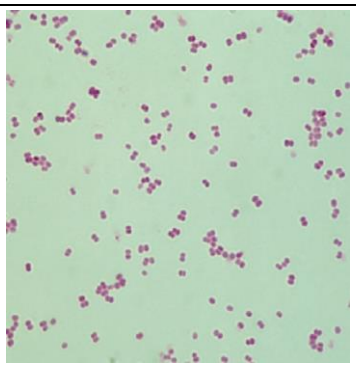


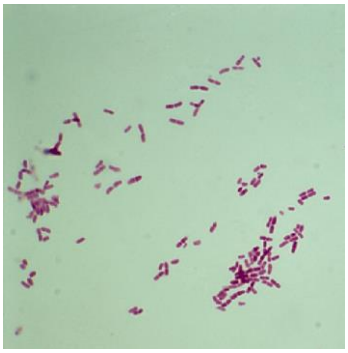
Colonias de Neisseria en agar sangre.



Colonias de Moraxella en agar sangre (Beta-hemólisis)

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión





En la figura de la izquierda *Neisseria sp.* en la figura de la derecha *Moraxella sp* en tinción de gram.

Tabla 4: Características morfológicas de *Neisseria sp*. y *Moraxella sp.*

Sensibilidad a la penicilina: Es una prueba utilizada para caracterizar a ciertos microorganismos por su sensibilidad o resistencia frente a una sustancia antimicrobiana. Esta prueba permite le diferenciación entre estas dos especies de diplococos.

- ✓ Técnica: Hacer una suspensión de las colonias en 1 ml de PBS 1X a una escala 5 de MacFarland. Sembrar masivamente con un hisopo estéril en el medio Mueller Hinton. Esterilizar la pinza, tomar el disco de Penicilina 10 U, colocar en el centro del medio haciendo un poco de presión. Incubar 37 °C por 18 a 24 horas.

Si se observa un halo de inhibición igual **o menor 26 mm** se considera resistente, característica de las colonias de ***Moraxella sp***, las cuales tiene producción de betalactamasas.

Si se observa un halo de inhibición **mayor a 26 mm** se considera sensible, característica de las colonias de ***Neisseria sp*.** Algunas cepas pueden presentar sensibilidad intermedia.

Como prueba adicional se recomienda realizar un Gram de las colonias crecidas cerca del borde de inhibición del disco de penicilina donde se evidencia un cambio en la morfología de *Moraxella sp* a bacilos Gram negativos.

9.1 FUNDAMENTO PRUEBAS API 20 E.

9.1.1 Voges-Proskauer

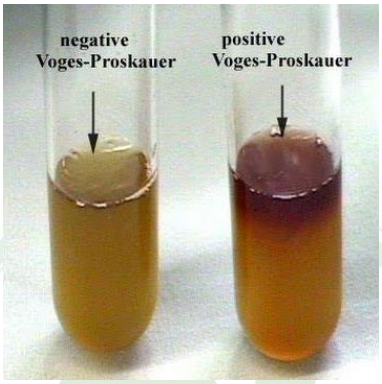
Esta prueba se realiza para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa con producción de un producto final neutro (acetoina) por la vía 2,3 butilenglicol.

- Sembrar, en el medio RM/VP, con un asa, un inóculo del microorganismo procedente de un cultivo
- Incubar a 37°C durante 48 horas
- Agregar de 3 -5 gotas de alfa naftol que intensifica el color.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Agregar 2-3 gotas de hidróxido de potasio al 40%.
- Dejar reposar 5 minutos y observar la reacción.

- **Interpretación:**
- La aparición de un halo rojo a vino tinto indica una reacción positiva y si no se evidencia aparición de color indica una reacción negativa.



En el medio RM/VP, además de poderse revelar el test de Voges-Proskauer, también se puede revelar la prueba de rojo de metilo.

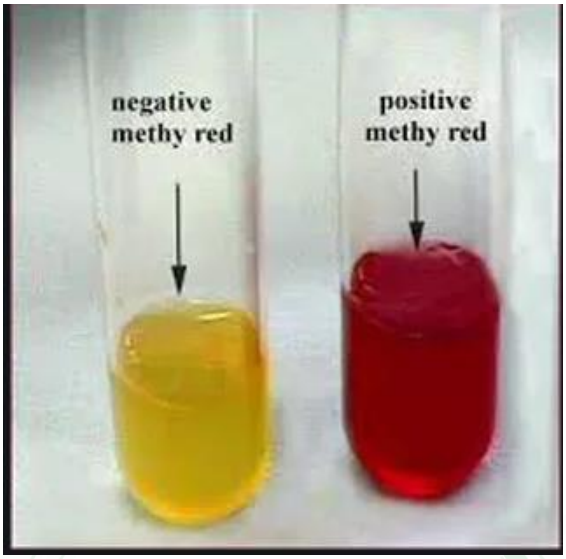
9.1.2 Rojo de Metilo

Se realiza para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa con producción de ácido por la vía de ácidos mixtos.

Al medio de cultivo una vez sembrado el inóculo:
Agregar de 3-5 gotas de rojo de metilo.
Dejar reposar 5 minutos y observar la reacción.

Interpretación:
La aparición de color rojo indica una reacción positiva y si no se observa ningún color indica una reacción negativa.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



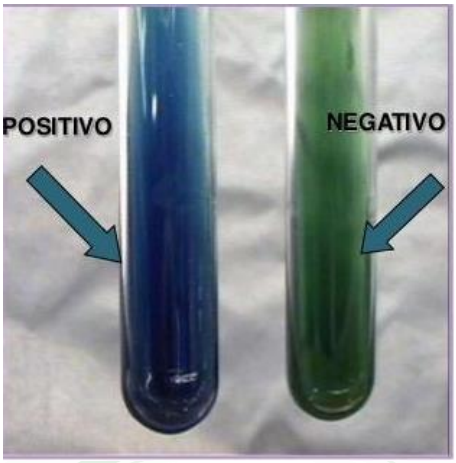
MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO	PRUEBA DEL ROJO DE METILO	PRUEBA DE VOGES PROSKAUER
Escherichia coli ATCC 25922	Satisfactorio	+	-
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Satisfactorio	-	+
Proteus mirabilis ATCC 43071	Satisfactorio	+	-
Salmonella typhimurium ATCC 14028	Satisfactorio	+	-
Enterobacter cloacae ATCC 13047	Satisfactorio	-	+

9.1.3 Prueba de Citrato

Esta prueba identifica si la bacteria es capaz de utilizar el carbono como fuente de energía. No se necesita adicionar reactivos, el medio tiene un indicador que es azul de bromo timol.

Interpretación: el cambio de color de verde a azul indica una reacción positiva, si no hay cambio de color indica una reacción negativa.

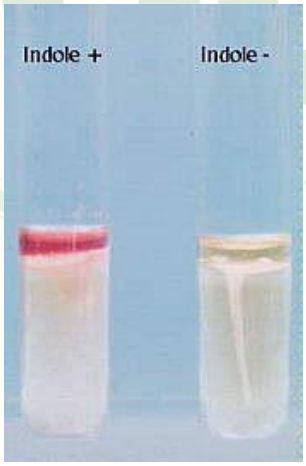
La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



9.1.4 Prueba del Indol

Esta prueba determina la habilidad del microorganismo de romper el indol del aminoácido triptófano. Se utiliza el caldo triptófano o SIM como medio de cultivo.

Interpretación: agregar 3-5 gotas del reactivo de Kovac's. Si el indol está presente se combina con producción de color en la capa del alcohol. La aparición de un color fucsia – rojo indica una reacción positiva, si no se observa la aparición de color indica una reacción negativa.

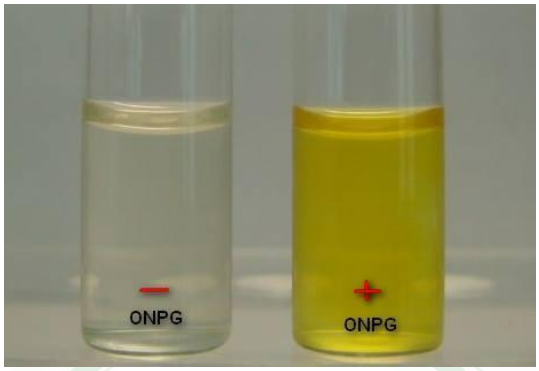


9.1.5 Prueba de O.N.P.G

Determina la ausencia o presencia de la enzima b-galactosidasa mediante el uso del compuesto orgánico o-nitrofenil-b-d-galactopiranosido que al ser hidrolizado produce un compuesto cromógeno amarillo.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

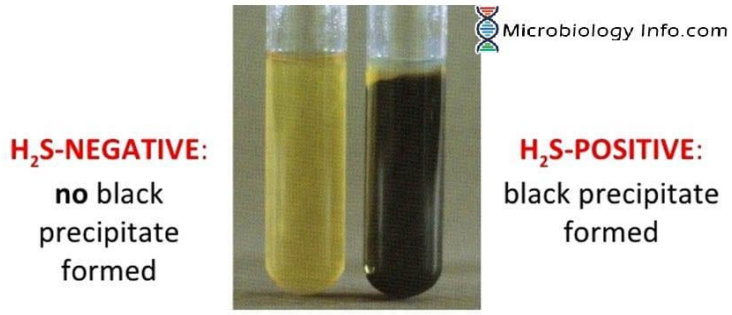
Interpretación: El cambio de color a amarillo indica una reacción positiva, si no hay evidencia de color indica una reacción negativa.



9.1.6 Producción de Ácido Sulfhídrico (H_2S)

- Se determina sembrando con un asa en el medio de cultivo TSI que contiene tiosulfato el cual libera ácido sulfhídrico que es un gas, este reacciona con la sal de hierro y genera un precipitado negro que es el Sulfuro ferroso.
- Los tubos se mantienen por 4 horas a temperatura ambiente.
- La aparición de una coloración negra alrededor del inóculo indica una reacción positiva.
- En caso de duda se incuba a temperatura ambiente o a 37°C, en microaerofilia por 24 – 48h.

I**nterpretación**: Se considera positivo cuando se evidencia formación de coloración negra alrededor del inóculo. Se considera negativo cuando no se evidencia cambio de color alrededor del inóculo.



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

9.1.7 Oxidasa

- La prueba de oxidasa determina la presencia del sistema de citocromo oxidasa. La oxidación se detecta como color azul.
- En la tira reactiva de oxidasa se coloca una colonia.
- El desarrollo de un color lavanda en 10-15 segundos se considera positivo.
- Si no se evidencia desarrollo de color se considera una prueba negativa.

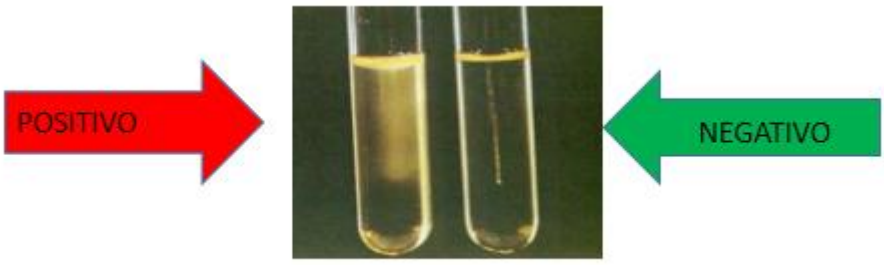


9.1.8 Motilidad

- En un tubo con agar motilidad inocular una colonia con el asa recta de forma vertical.
- Incubar el tubo verticalmente a 36-38ºC por 24 horas en atmósfera de microaerofilia.

I**nterpretación:**

Positivo: Crecimiento difuso alrededor de la línea de inoculación.
Negativo: Crecimiento únicamente en la línea de inoculación



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

9.2 KITS COMERCIALES DE IDENTIFICACIÓN CON PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se utilizan kits comerciales que vienen con las pruebas bioquímicas ya establecidas. Después de la incubación se le añaden algunos reactivos reveladores y se leen las reacciones bioquímicas, donde el código obtenido genera la identificación del microrganismo. Se recomienda siempre leer el inserto para el montaje y seguir sus indicaciones. Entre los kits comerciales usados están: BBL CRYSTAL, ENTERO PLURITEST, ENTEROSYSTEM 18R y API 20E.

A continuación, como ejemplo se ilustra el API 20E.

API 20E

Es un sistema estandarizado que permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes, que incluye 21 test bioquímicos miniaturizados, así como una base de datos.
La galería del sistema API 20 E se compone de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye los test. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos.

La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la Tabla de Lectura, y la identificación se obtiene con la ayuda del Catálogo Analítico o del software de identificación.



Identificación de API20E después de realizar la revelación.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



APOYO DIAGNÓSTICO

9.3 OTRAS PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

9.3.1 Hemólisis

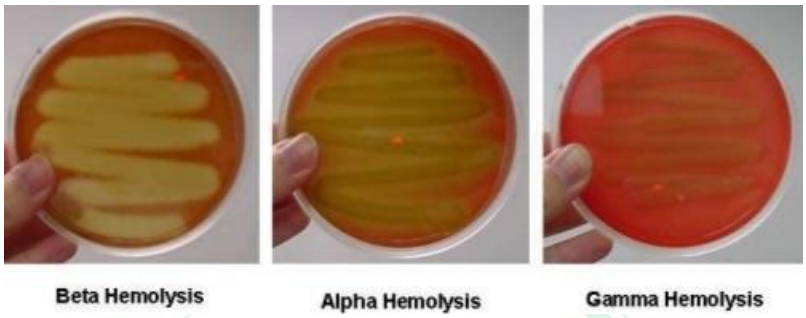
Se utiliza el agar sangre para determinar si el microorganismo tiene unas enzimas llamadas hemolisinas las cuales rompen los glóbulos rojos. La base del agar sangre generalmente suplementada con sangre de cordero, conejo o caballo al 5-10% se usa para aislar, cultivar y estudiar reacciones hemolíticas de una amplia variedad de microorganismos fastidiosos patógenos.

Resultados:

Los *Streptococcus* hemolíticos presentan colonias traslucidas u opacas, grises, pequeñas y mucoides con una zona de hemólisis alrededor de la misma.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Beta hemólisis: hay hemólisis total y se observa la colonia de color amarillo. Ej. *Staphylococcus aureus.*
Alfa hemólisis: hay hemólisis parcial y la colonia se observa de color verde. Ej. *Streptococcus pneumoniae.*
Gamma hemólisis: no hay hemólisis.



9.3.2 Susceptibilidad a Antimicrobianos

- ### 9.3.2.1 Novobiocina

Fundamento: Se basa en que ciertas bacterias son sensibles a la **Novobiocina**.
Procedimiento: Se inocula el microorganismo en agar Mueller Hinton utilizando discos de Novobiocina de 5 microgramos (5 µg), se incuba durante 24 horas a 33° - 35°

Interpretación: Sensible => Inhibición del crecimiento con un diámetro mayor o igual a 16 mm.

Se usa para diferenciar a *Staphylococcus epidermidis* de *Staphylococcus saprofiticus*, donde el primero presenta sensibilidad a este antibiótico y el segundo presenta resistencia.



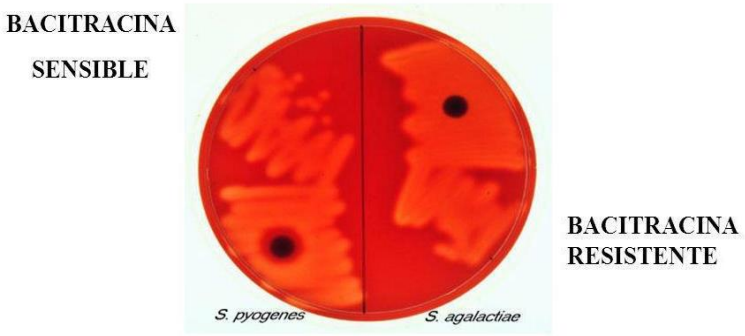
La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- **9.3.2.2 Bacitracina**

Fundamento: Se basa en que ciertas bacterias son sensibles a la **Bacitracina.**
Procedimiento: Se inocula el microorganismo en agar sangre utilizando discos de Bacitracina de 0.04 U. Se incuba durante 18 - 24 horas a 33° - 35° en atmósfera de microaerofilia.

Interpretación: Sensible => Cualquier halo de inhibición del crecimiento se considera positivo.

Se usa para diferenciar a *Streptococcus pyogenes* de *Streptococcus agalactiae*, donde el primero presenta sensibilidad al antibiótico y el segundo presenta resistencia.



- **9.3.2.3 Optoquina**

Fundamento: Se basa en que ciertas bacterias son sensibles a la **Optoquina.**
Procedimiento:
Suspender el microorganismo de un cultivo fresco en solución fisiológica estéril hasta una densidad óptica del tubo 0.5 de la escala de Mac Farland.
Sembrar en forma masiva con hisopo estéril sobre la superficie de una placa de agar sangre.
Colocar con una pinza estéril un sensidisco de Optoquina.
Incubar a 35° por 24 horas en atmósfera de microaerofilia.
Una vez cumplido el tiempo de incubación, observar la presencia o ausencia de halo.

Interpretación: Sensible => Inhibición del crecimiento con un halo mayor a 14 mm. Halos entre 9 y 14 mm deben confirmarse con la prueba de solubilidad en Bilis.

Se usa para diferenciar Streptococcus *pneumoniae* de *Streptococcus viridans*, donde el primero presenta sensibilidad al antibiótico y el segundo presenta resistencia.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



9.3.3.3 Identificación de microorganismos por proteómica – MALDI-TOF

Previo al inicio del desarrollo de la prueba, se requieren los siguientes pasos preliminares:

Previo al uso del equipo

1. Encender el computador y la pantalla. Posteriormente, agregar los datos de usuario y contraseña

Usuario: tof-user
Contraseña: bruker12

2.Encender el equipo MALDI TOF Biotyper
3.Limpiar la junta de goma de la tapa pasando un dedo por la superficie de la junta.



4**.** El módulo porta-tarjetas (porta placa) debe estar dentro del equipo y con la tapa cerrada. En la pantalla del equipo debe aparecerá iluminado el indicador verde “Target Access”.

Limpieza y desinfección placa MSP 96 ref#8280800

Previo al uso de la placa:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

1. Cubrir la placa con etanol (70%) y dejarla cubierta durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Limpiar la placa con agua tipo I o tipo II y secarla con un papel absorbente que no genere motas .
3. Cubrir nuevamente la placa con etanol (70%) y dejarla cubierta durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Limpiar la placa con agua tipo I o tipo II y secarla con un papel absorbente que no genere motas. Verificar que quede completamente seca.
5. Aplicar 100 µl de ácido trifluoroacético (80%) en la placa y frotar toda la placa con una toalla de papel que no genere motas.

Precaución: Nunca manipular el ácido trifluoroacético (80%) ni el material impregnado con este compuesto **sin** guantes.

6. Dejar secar la placa a temperatura ambiente por 30 minutos.

Resuspensión de matriz HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico)

El HCCA viene liofilizado en tubos de 2.5 mg, por lo que antes de usar, se requiere resuspender en solvente que contenga: Acetonitrilo: 50%, agua: 47.5% y ácido trifluoroacético: 2.5%.

Nota: el solvente puede ser adquirido comercialmente. Las marcas recomendadas por Bruker son: Sigma Aldrich (ref: 900666), Honeywell Riedel-de Haen (ref: 19182) y VWR International (ref: PRLS89449.230)

Procedimiento de resuspensión de HCCA

1. Adicione 250 µl de solvente estándar a un tubo de 2.5 ml de matriz liofilizada. Cierre la tapa del tubo verificando que queda completamente cerrado.

2. Agite el tubo en vortex a temperatura ambiente hasta que la totalidad de la matriz se haya disuelto. Preste especial atención a que no se evidencie presencia de cristales.

3.Realice un movimiento manual al tubo para que baje todo el líquido atrapado en la tapa.

Calibración equipo

El equipo cuenta con un extracto de bacteria para la calibrar el equipo, este es denominado “BTS” por sus siglas en inglés (Bacterial Test Standard). El BTS es un extracto de *E. coli* alfa DH5 que muestra un perfil característico de péptidos y proteínas en los espectros de masa de MALDI-TOF. Adicionalmente, contiene extracto de dos proteínas adicionales que extienden el límite superior del rango de masas cubierto por Bruker BTS. El rango de masas total cubierto por el BTS es 3,6 a 17 KDa.
Este procedimiento debe llevarse a cabo cada vez que utilice un frasco nuevo de matriz HCCA.

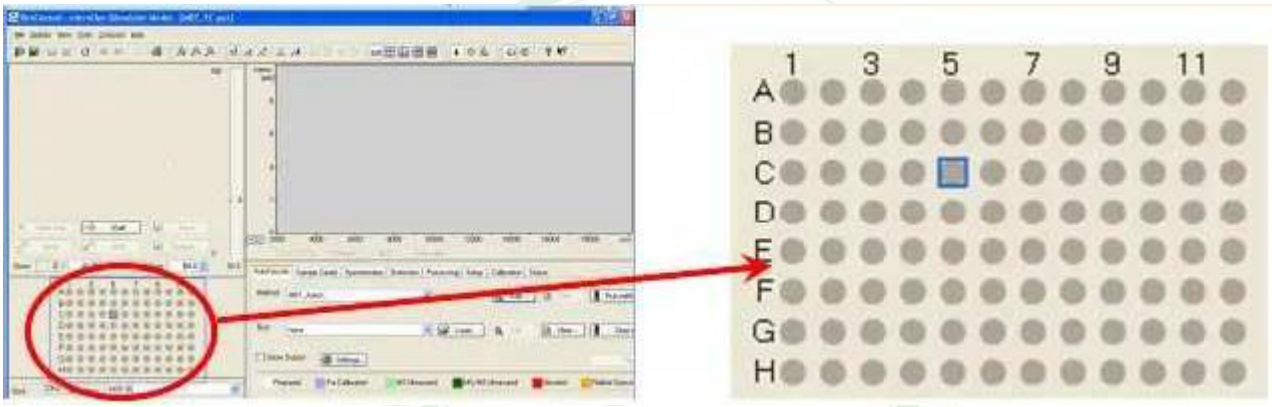
Solubilización y preparación de alícuotas de BTS

1. Agregar 50 µl de solvente al pellet BTS y disolver realizando pipeteo hacia arriba y hacía abajo al menos 20 veces a temperatura ambiente. Evitar la formación de burbujas/espuma.
2. Incubar la solución por 5 minutos a temperatura laboratorio y luego repetir pipeteo del paso anterior.
3. Centrifugar 13000rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Realizar alícuotas de 5 µl de sobrenadante en microtubos de tapa rosca. Cerrar con fuerza.
5. Almacenar alícuotas a -18°C o menos

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

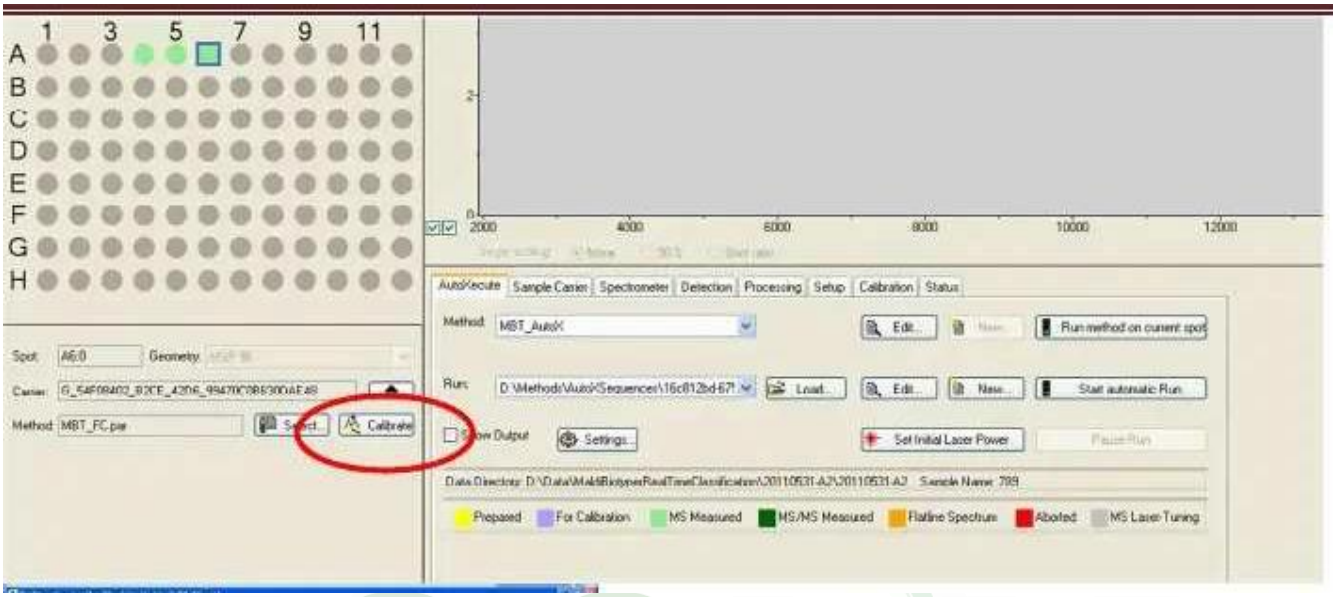
Procedimiento de calibración automática

1. Pipetee 1,0 µl de control BTS en un pozo desocupado de la placa de MALDI y deje secar a temperatura ambiente.
Nota: Una vez usado el BTS, cierre el frasco y confirme que quede herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
2. Añadir 1,0 µl de matriz HCCA al pozo con BTS y dejar secar a temperatura ambiente.
3. Introducir la placa en equipo.
4. En el computador, abrir el programa **Flexcontrol.**
5. En la parte inferior derecha de la ventana del programa aparece el estado del MALDI TOF y de la placa. Esperar a que aparezca la palabra “READY” en el estado del MALDI TOF e “IN” en el estado de la placa.
6. En el mapa que se muestra en el Flexcontrol, seleccionar el pozo en el cual se adiciono el BTS.



7. Dar click en el botón “calibrate”. El equipo realiza la calibración y arroja un mensaje de “aceptación” o “rechazo” según sea el caso.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



Nota: Los parámetros de calibración se encuentran definidos por defecto y no se deben cambiar.

Preparación de muestras y controles

Los procedimientos descritos a continuación deben llevarse a cabo en cabina de flujo laminar tipo II, con el fin de garantizar la bioseguridad y esterilidad del proceso.

Preparación de la muestra con la matriz HCCA a partir de cultivos bacterianos sólidos

1. Con un asa estéril tome una colonia pura directamente desde el agar y transfiera a un pozo desocupado de la placa de MALDI. Repita este proceso con las muestras que vaya a analizar.
Nota: es muy importante que la colonia que se tome esté claramente pura dado que, si se toma una mezcla de diferentes microorganismos, no se podrá obtener la identificación por MALDI TOF.
2.Pipetee 1,0 µl de BTS como control en un pozo desocupado de la placa y deje secar a temperatura ambiente
Nota: Una vez usado el BTS, cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
3.Cubra cada uno de los pozos de muestras y control BTS con 1,0 µl de HCCA. El HCCA debe ser aplicada máximo 30 minutos después de que se colocó la muestra o el BTS en la placa. Si se supera este tiempo, la muestra o el BTS no debe ser analizado.
Nota: Una vez usado el BTS cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
4.Deje secar la matriz HCCA en los pozos a temperatura ambiente. En este punto se debe observar una mezcla homogénea entre la matriz HCCA y la muestra o el BTS
5.Lleve la placa al equipo de MALDI para su análisis.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Preparación de la muestra con la matriz HCCA a partir de cultivos bacterianos líquidos

1. Transfiera 1,0 µl del medio líquido a un pozo desocupado de la placa. Repita este proceso para todas las muestras que se vayan a analizar.
Nota: Es muy importante que el cultivo esté puro dado que, si se toma una mezcla de diferentes microorganismos, no se podrá obtener la identificación por MALDI TOF.
2. Pipetee 1,0 µl de control BTS en un pozo desocupado de la placa y deje secar a temperatura ambiente
Nota: Una vez usado el BTS cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
3.Cubra cada uno de los pozos de muestras y control BTS con 1,0 µl de matriz HCCA. El HCCA debe ser aplicada máximo 30 minutos después de que se colocó la muestra o el BTS en la placa. Si se supera este tiempo, la muestra o el BTS no debe ser analizado.
Nota: Una vez usado el BTS cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
4.Deje secar la matriz HCCA en los pozos a temperatura ambiente. En este punto se debe observar una mezcla homogénea entre la matriz HCCA y la muestra o el BTS
5.Lleve la placa al equipo MALDI para su análisis.

Preparación de la muestra con la matriz HCCA a partir de cultivos bacterianos sólidos (Protocolo extendido)

Nota: Este protocolo es recomendado para microorganismos difíciles como Micobacterias

1.Con un asa estéril tome una colonia pura directamente desde el agar y transfiera a un pozo desocupado de la placa de MALDI. Repita este proceso para todas las muestras que se vayan a analizar
Nota: Es muy importante que la colonia que se tome esté claramente pura dado que, si se toma una mezcla de diferentes microorganismos, no se podrá obtener la identificación por MALDI TOF.
2.Pipetee 1,0 µl de ácido fórmico (70%) y deje secar a temperatura ambiente.
3.Pipetee 1,0 µl de control BTS en un pozo desocupado de la placa y deje secar a temperatura ambiente.
Nota: Una vez usado el BTS cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
4.Cubra cada uno de los pozos de muestras y control BTS con 1,0 µl de matriz HCCA. La matriz HCCA debe ser aplicada máximo 30 minutos después de que se colocó la muestra o el BTS en la placa. Si se supera este tiempo, la muestra o el BTS no debe ser analizada.
Nota: Una vez usado el BTS cierre el frasco y confirme que queda herméticamente cerrado para minimizar la evaporación del solvente.
5.Deje secar la matriz HCCA en los pozos a temperatura ambiente. En este punto se debe observar una mezcla homogénea entre la matriz HCCA y la muestra o el BTS.
6.Lleve la placa al equipo MALDI para su análisis.

Preparación de la muestra con la matriz HCCA a partir de cultivos de hongos filamentosos (método rápido).

1. Pipetee 1,0 µl de ácido fórmico (70%) en un pozo desocupado de la placa de MALDI.
2.Posteriormente, sumerja un asa recta en la gota de ácido fórmico y luego tome una muestra de micelio, luego deposítela en la gota de ácido fórmico.
3. Deje secar a temperatura ambiente.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

4. Cubra cada uno de los pozos de muestras y control con 1,0 µl de matriz HCCA. La matriz HCCA debe ser aplicada máximo 30 minutos después de que se colocó la muestra o el control en la placa. Si se supera este tiempo, la muestra o el control no debe ser analizada.
5.Deje secar la matriz HCCA en los pozos a temperatura ambiente. En este punto se debe observar una mezcla homogénea entre la matriz HCCA y la muestra o el control.
6.Lleve la placa al equipo MALDI para su análisis.

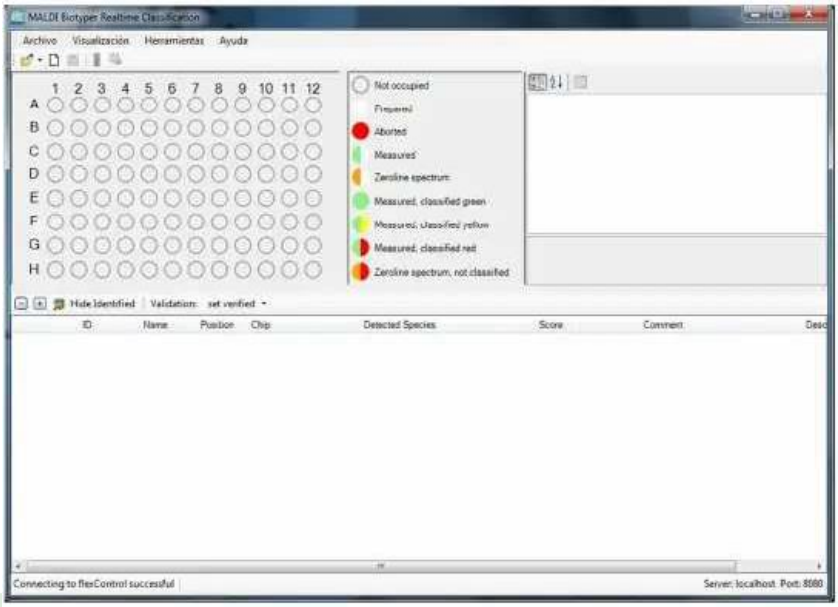
Preparación de la muestra con la matriz HCCA a partir de cultivos de levaduras.

1. Agregue 50 µl de agua estéril en microtubos de 1,5 ml (tanto para muestras como controles).
2. Con el apoyo de un asa de inoculación de 1,0 µl, tome una colonia aislada de levadura y transfiera al microtubo que contiene 50 µl de agua estéril (muestras y controles respectivamente). Luego, asegure la tapa del tubo.
3. Agregue 50 µl de etanol al 100% en cada tubo.
4. Mezclar con el apoyo de micropipeta ajustada a 50 µl y pipetear el líquido de arriba hacia abajo 10 veces para homogenizar.
5.Producto de la suspensión previamente realizada, agregue 1,0 µl a la placa en un pozo libre.
6. Permitir que el inóculo se seque por 2 minutos a temperatura ambiente.
7. Cubra el inóculo seco con 1,0 µl de ácido fórmico al 70%.
8. Seque por 2 minutos a temperatura ambiente.
9. Agregar BTS a un pozo libre de ácido fórmico.
10. Tan pronto se sequen los inóculos agregar 1,0 µl de matriz HCCA.
11. Seque por 2 minutos a temperatura ambiente.
12 Lleve la placa al equipo MALDI para su análisis.

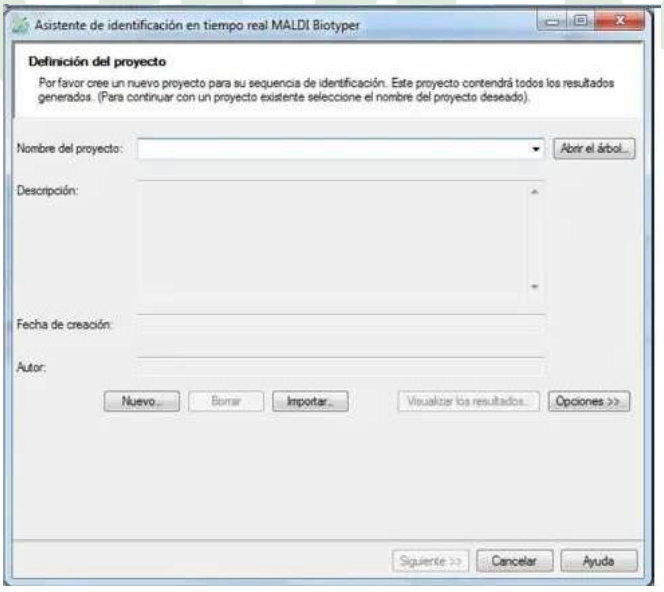
Análisis de muestras

1. Comprobar que el programa FlexControl se esté ejecutando, si no, abrirlo.
2. Pulsar el botón IN/OUT en el MALDI TOF e insertar la placa en el equipo. Comprobar que la placa quedó ingresada correctamente y que no esté inclinada.
3.Pulsar el botón IN/OUT en el MALDI TOF para que la placa quede dentro del equipo. En el MALDI TOF se encenderá una luz naranja indicando que se está ingresando la placa. Esperar a que la luz esté en verde
4.Abrir la aplicación MALDI Biotyper RTC. Aparecerá la siguiente ventana:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

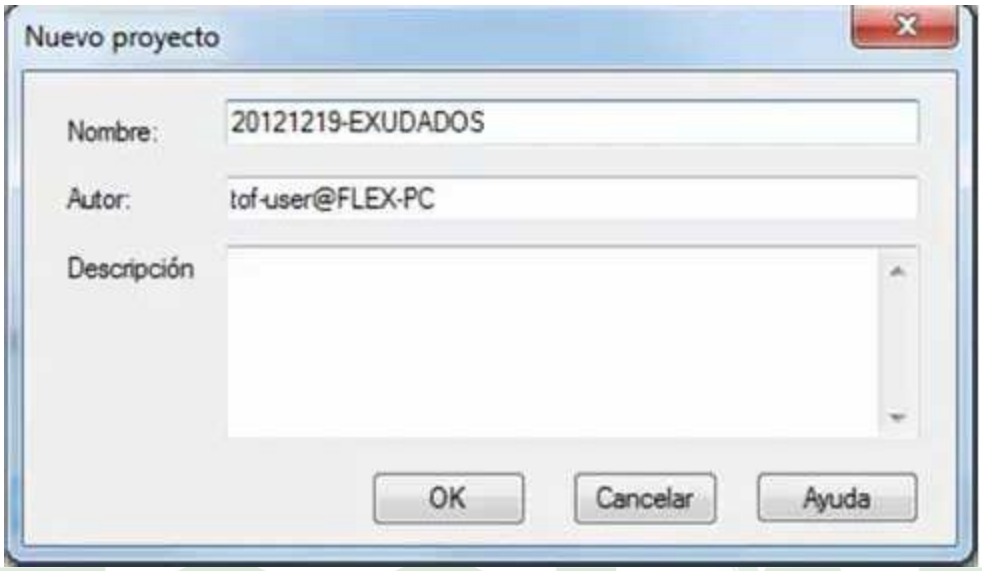


5. Dar click en la opción “ARCHIVO” (menú superior) y luego en “NUEVA IDENTIFICACIÓN”. Se despliega la siguiente ventana:

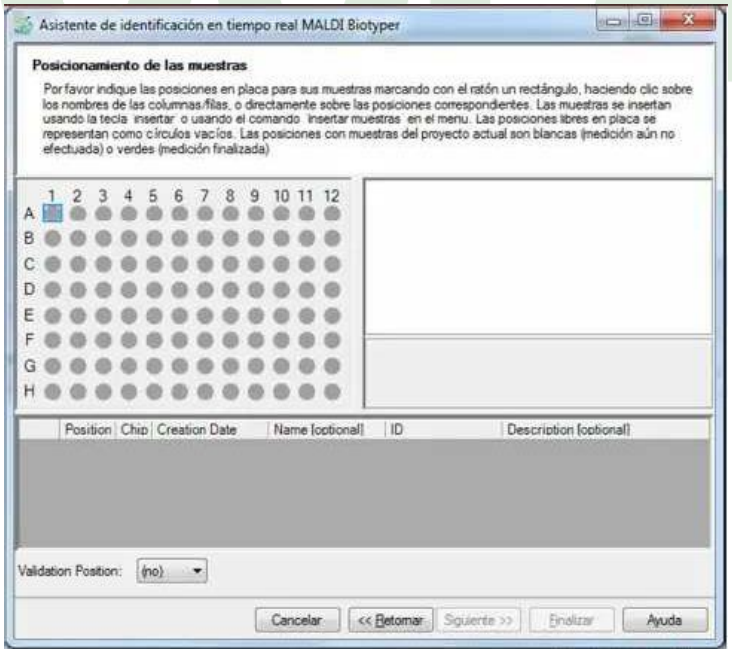


6. Dar click en la opción “NUEVO”. Se despliega la siguiente ventana:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

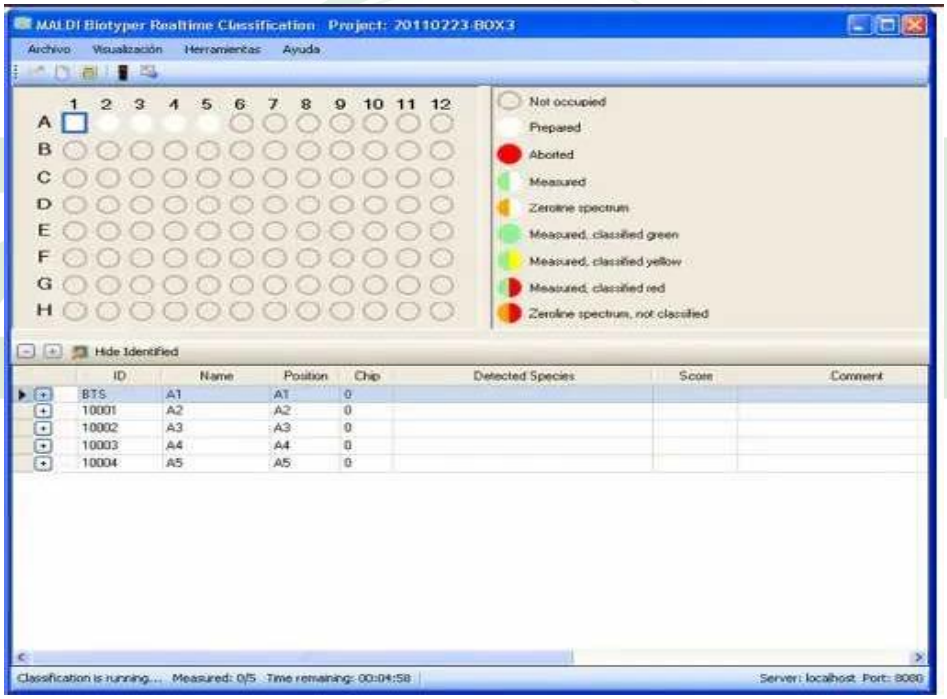


7. Colocar el nombre del proyecto. Se recomienda colocar un nombre con la siguiente estructura: DíaMesAño_consecutivo del día (DDMMAAAA_consecutivo). Pulsar el botón OK y posteriormente el botón "SIGUIENTE". Se abre la siguiente ventana:

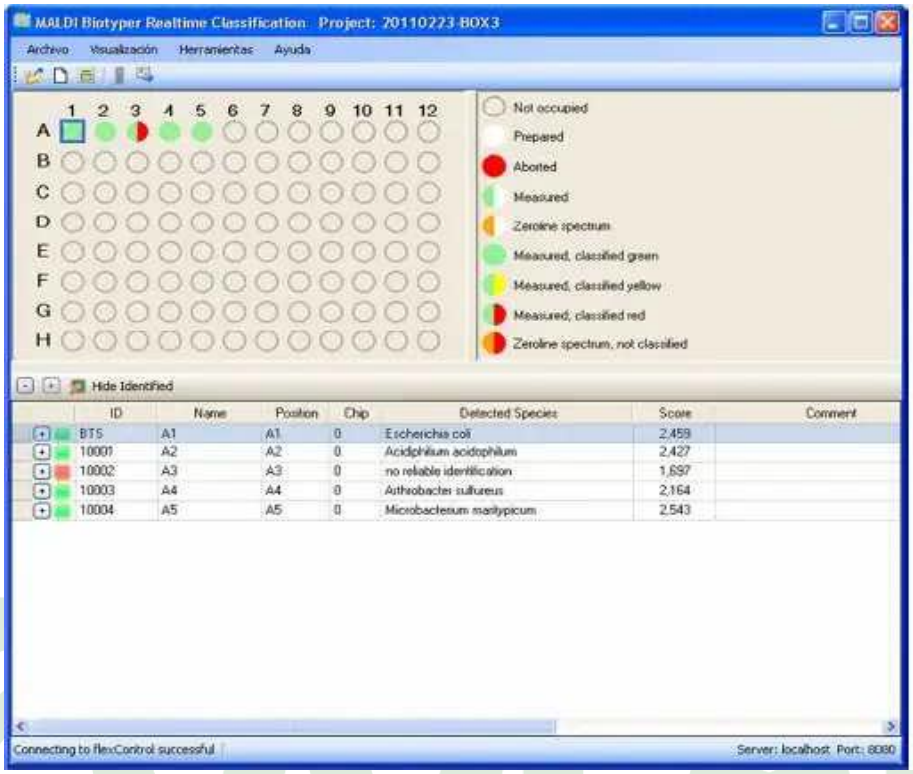


La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

8. En el mapa de la placa, seleccionar el primer pozo de la primera fila en el cual se encuentran las muestras, dar click derecho sobre el pozo y seleccionar la opción “Sequential InserMode”. Posteriormente, colocar el número de pozos con muestras en la fila seleccionada.
9.Repetir el proceso para las siguientes filas hasta tener seleccionados todos los pozos con muestra
10.Dar click en finalizar
Nota: Antes de dar click en finalizar, verificar que la placa ya esté lista para su análisis en el interior del MALDI TOF y que el equipo esté en con la luz verde en el indicador TARGET: ACCESS
11.En el MALDI TOF, se encenderá en verde el indicador SYSTEM: AUTOMODE y el análisis comenzará de forma automática
12.Aparece la siguiente ventana donde podemos ir viendo tanto el análisis de las muestras como su identificación a tiempo real.



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



13.Para ver o imprimir el informe de resultados dar click en la opción “View” y luego en la opción “Results”.
14.Para retirar la placa, oprimir el botón IN/OUT en el MALDI TOF. Se encenderá la luz naranja en el indicador TARGET: IN PROGRESS. Esperar hasta que se encienda la luz verde en el indicador TARGET: ACCESS
15.Abrir la tapa del MALDI TOF y sacar la tarjeta. Posteriormente, oprimir el botón IN/OUT en el MALDI TOF para desplazar el reservorio de la placa al interior del equipo. Se iniciará automáticamente el vació para dejar listo el equipo para el siguiente análisis.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

10. CULTIVO BACTERIAS AEROBIAS, AEROBIAS FACULTATIVAS Y MICROAEROFILICAS

TÉCNICA: CULTIVO BACTERIAS AEROBIAS, AEROBIAS FACULTATIVAS Y MICROAEROFÍLICAS

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Fluidos, secreciones, excreciones y tejidos de cualquier especie animal	Aislamiento de bacterias aerobias, aerobias facultativas o microaeofílicas en muestras biológicas de fluidos, secreciones, excreciones y tejidos.	Aislamiento e identificación	Bacterias aerobias, aerobias facultativas o microaeofílicas	24 - 72 horas

- Atemperar a 18-25°C una caja de Agar sangre, una de Agar Chocolate y una de Agar Mc Conkey para la siembra de muestras que no requieren enriquecimiento.
- Si las muestras requieren enriquecimiento: Atemperar a 18-25°C medio líquido de enriquecimiento BHI
- Marcar los medios de cultivo con el número de caso asignado y la identificación de la muestra.
- Si la muestra viene en medio de transporte tomar el hisopo y realizar 1 o 2 estrías sobre cada caja de agar: importante realizar estos procedimientos frente al mechero o en la cabina de seguridad biológica, empezar por el Agar Chocolate, seguir con el Agar Sangre y por último el agar Mc Conkey.

- Con ayuda de un asa curva realizar la siembra por agotamiento.

- **Muestras de Orina y Leche:** se debe obtener la muestra desde el recipiente con el asa curva, trazar una estría en agar sangre. Repetir el procedimiento en el Agar Mac Conkey. A partir del inóculo sembrar por agotamiento.

- **Muestras de Tejidos y Líquidos Estériles**: se debe primero sembrar en un medio de enriquecimiento (BHI) durante 3 días antes de realizar la siembra en agar sangre, agar chocolate y agar Mac Conkey.

- **Muestras de Materia Fecal**: Sembrar en Tetrationato, incubar 37°C durante 24 horas, posteriormente sembrar en Agar Salmonella-Shiguella y en Agar McConkey.

- Si hay crecimiento en alguno de los medios inoculados, realizar coloración de Gram, identificación bioquímica y antibiograma.

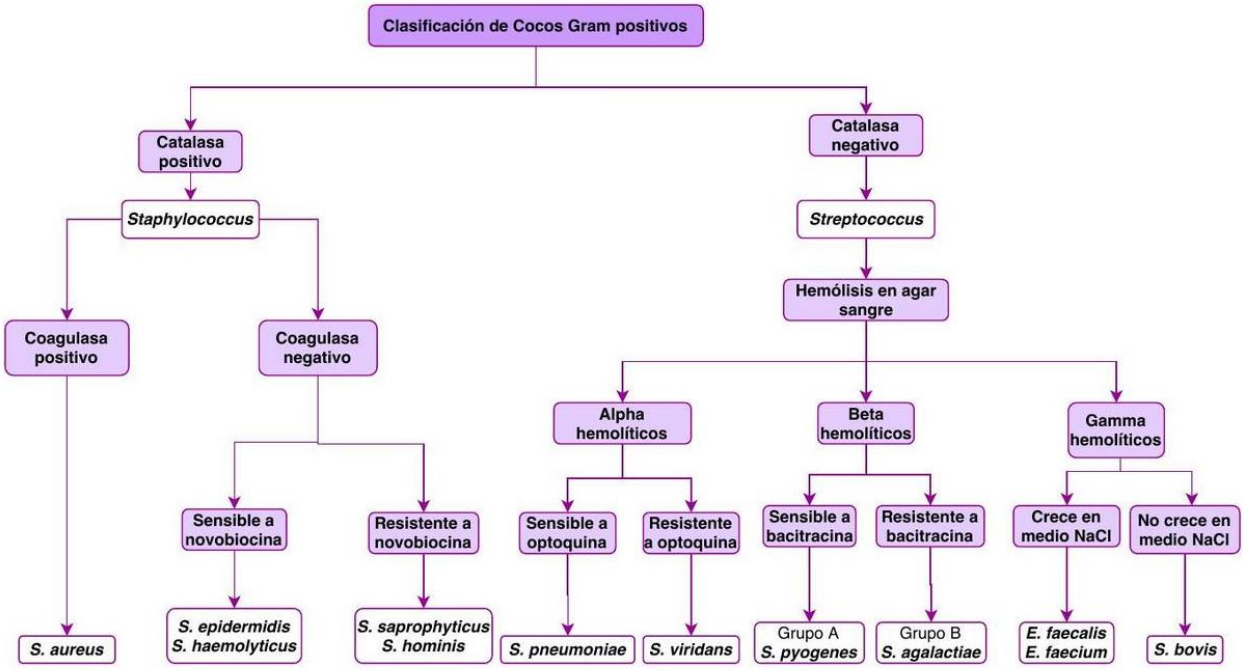
- Consignar lo observado en el LBFMT 031 Registro de microbiología.

- **Interpretación**: Un **cultivo negativo** es aquel en el cual no se evidencia crecimiento bacteriano después de finalizar el tiempo de incubación en los medios sólidos. Un **cultivo positivo** es aquel en el que se evidencia crecimiento bacteriano durante el tiempo de incubación. El crecimiento debe evidenciarse sobre las estrías de siembra, si se observan colonias distantes de las estrías de siembra, deben ser consideradas como contaminación, en este caso el cultivo también se interpretaría como negativo.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

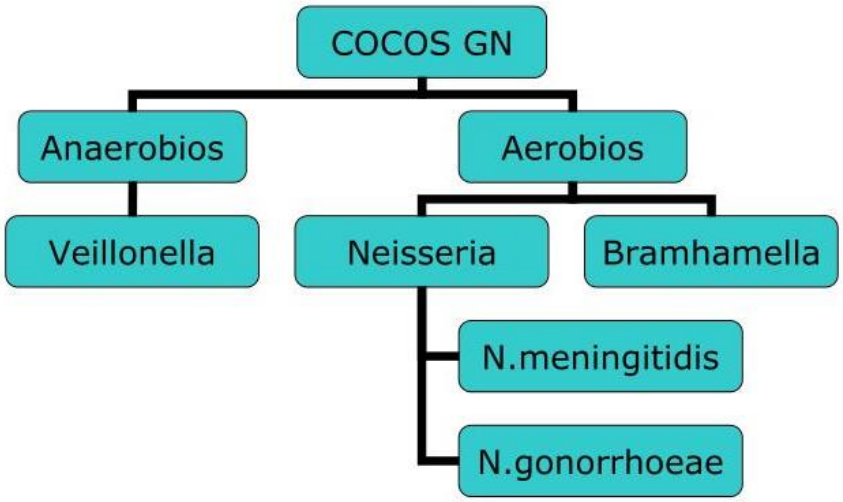
11. FLUJOGRAMAS PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

11.1 IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAMPOSITIVOS

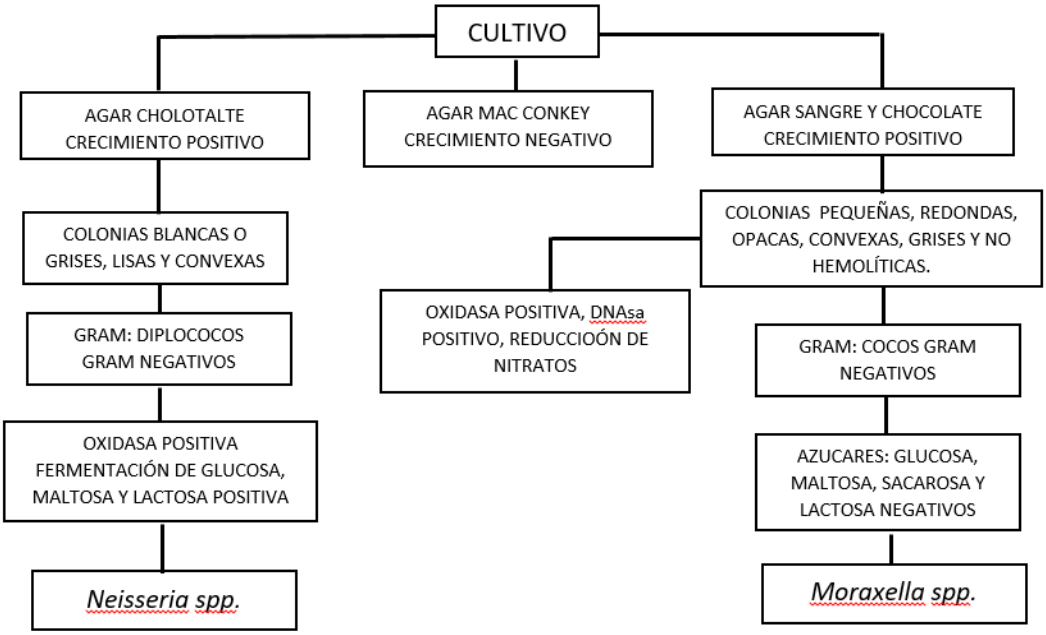


La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

11.2 IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAMNEGATIVOS

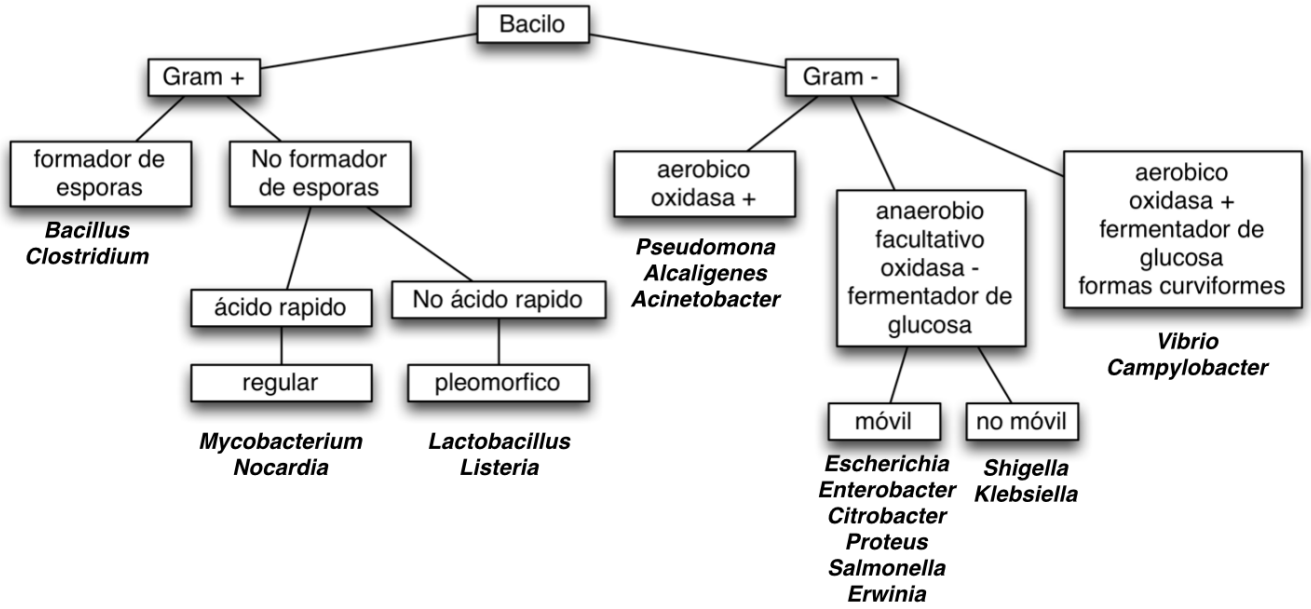


La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



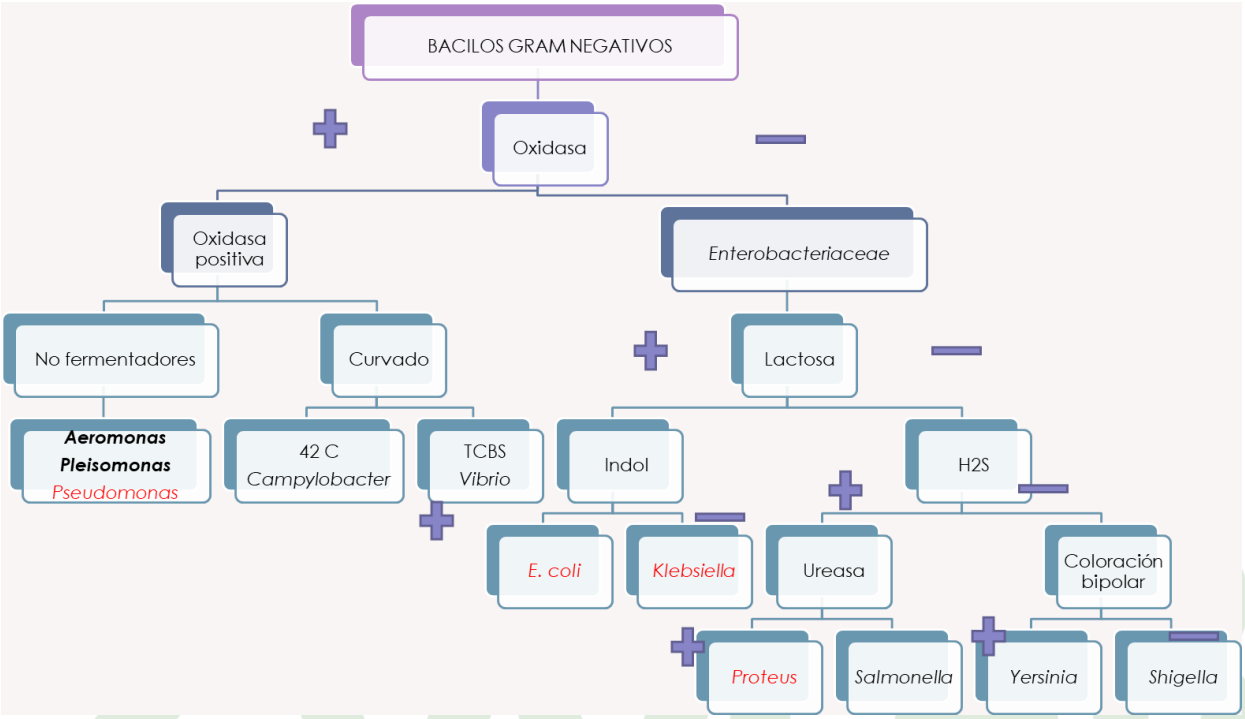
11.3 IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAMPOSITIVOS Y GRAM NEGATIVOS

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



11.4 IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAMNEGATIVOS

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

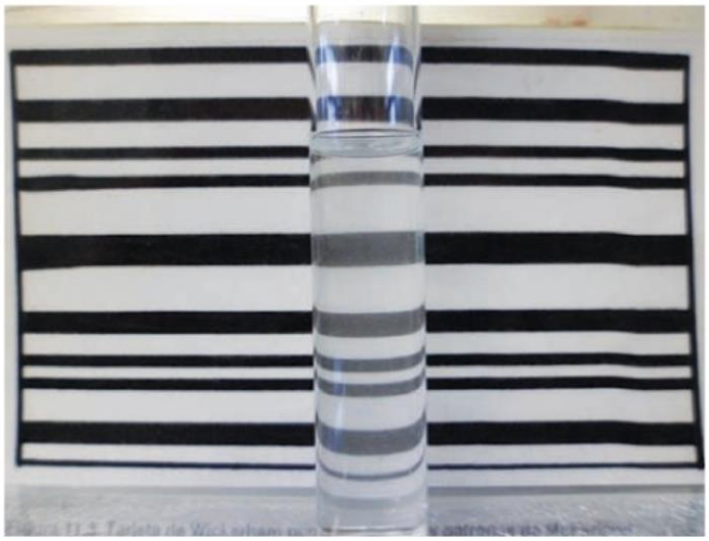


La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

12. ANTIBIOGRAMA

Para el antibiograma se debe realizar una siembra masiva de la bacteria por evaluar en agar sangre o en agar Muller-Hinton, el cual permite el crecimiento de la mayoría de microorganismos. Se colocan sobre el agar Muller-Hinton ya sembrado pequeños discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos (Sensidiscos). Al colocar los sensidiscos sobre el agar, estos absorben agua del medio, lo que permite la disolución del antibiótico y su difusión. De esta manera se genera un gradiente de concentración del antibiótico en el agar que rodea cada sensidisco.
Después de la incubación se observará cuándo hay inhibición: la formación alrededor del sensidisco de una zona de no-crecimiento, correspondiente a la zona donde las concentraciones de antibiótico son inhibitorias, seguida de una zona de crecimiento masivo. Mientras más sensible sea la bacteria al antibiótico, más grande será el halo de inhibición.
Para realizar la prueba del antibiograma es necesario partir de una concentración inicial conocida del microorganismo y, en lo posible, estandarizar esta concentración para probar la resistencia o susceptibilidad a los diferentes antibióticos. Para lograr esto, se utiliza el patrón de MacFarland el cual es un sistema indirecto que permite estandarizar el número de bacterias que hay por mililitro de medio. Utilizando los patrones ya establecidos se compara la solución bacteriana con dichos patrones sobre la tarjeta de Wickerham. Utilizando los patrones de MacFarland se compara el tubo con la bacteria para obtener un número estándar de células por mililitro. Se ajusta la turbidez del medio diluyéndolo con solución salina hasta obtener una densidad óptica igual a la del estándar de MacFarland.

Vanegas López, M. C. (2015). Guías para el laboratorio de bacteriología. Bogotá, Colombia: Universidad de los Andes. Recuperado de https://ezproxy.uniagraria.edu.co:2081/es/ereader/bibliouniagraria/70556?page=102.



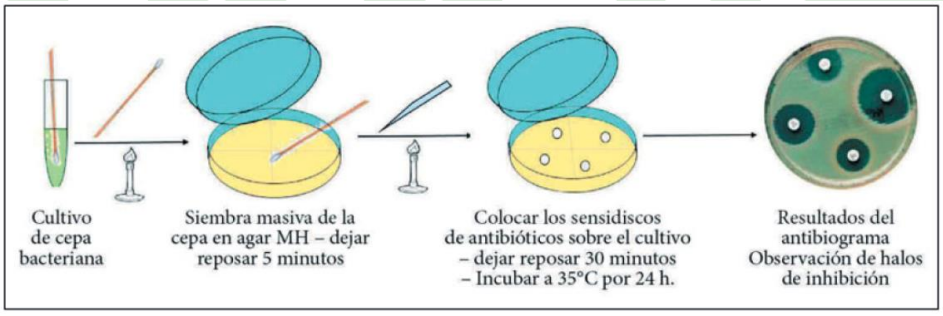
Escala de MacFarland sobre una tarjeta de Wickerham.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

La efectividad de los antibióticos depende de su toxicidad selectiva. Esto hace referencia a la capacidad del antimicrobiano para afectar a un microbio patógeno infligiendo el menor daño posible al huésped. Según el tipo de microorganismo al que afecten, se clasifican como: anti protozoarios, antivirales, antimicóticos y antibacterianos. Un aspecto importante de los antimicrobianos es el mecanismo de acción por medio del cual realizan su tarea. Según Wright, los antibióticos ejercen su actividad antimicrobiana causando daño en alguno de los siguientes procesos vitales de las bacterias:

- Síntesis de pared celular: es el caso de antibióticos Betalactámicos como las penicilinas, las cefalosporinas y las vancomicinas.
- Replicación, transcripción y síntesis proteica a nivel del ribosoma: como ejemplo se encuentran Macrólidos como eritromicina y clindamicina; y Aminoglucósidos como gentamicina y estreptomicina.
- Permeabilidad de la membrana plasmática: antibióticos polimixinas.
- Síntesis de ácidos nucleicos: antibióticos quinolónicos como ciprofloxacina y norfloxacina.

Las pruebas de sensibilidad bacteriana son técnicas que se utilizan para determinar la eficacia antimicrobiana que presenta un determinado compuesto frente a un patógeno específico, es decir, la sensibilidad que el microbio muestra ante el agente antimicrobiano.



Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. También es importante para realizar estudios sobre la evolución de las resistencias bacterianas que permite revisar los protocolos de la antibioticoterapia empírica.

La determinación de la **Concentración Mínima Inhibidora (CMI)** es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

La **Concentración Mínima Bactericida (CMB)** es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

TÉCNICA: ANTIBIOGRAMA - KIRBY BAUER

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Aislamientos de cultivo de bacterias aerobias o aerobias facultativas	Determinación de sensibilidad microbiana a antibióticos en microorganismos aislados en cultivos de gérmenes comunes. Extendido y coloración	KIRBY **BAUER**	Hasta 7 antibióticos	24 horas

12.1 Desarrollo de la prueba

- El antibiograma se debe hacer a partir de un cultivo puro en medio Mueller Hinton, excepto para los géneros Haemophilus y Streptococcus, para los cuales se debe usar Agar Chocolate y Agar Sangre respectivamente.
- Atemperar un medio de Mueller Hinton (o Agar Sangre o Chocolate si es requerido) y marcarlo con el número de caso correspondiente.

- **Preparación del inóculo:** A partir de la placa de cultivo tomar cuatro a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, con un asa de siembra y preparar una suspensión directa en solución salina estéril. Ajustar la suspensión a la escala 0,5 de Mc. Farland.

- **Inoculación de las Placas**: Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Inocular la superficie seca de la placa de Mueller Hinton (o Agar Sangre o Chocolate si es requerido), distribuyendo con el hisopo en tres direcciones por siembra masiva para asegurar una distribución uniforme del inóculo.

- Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

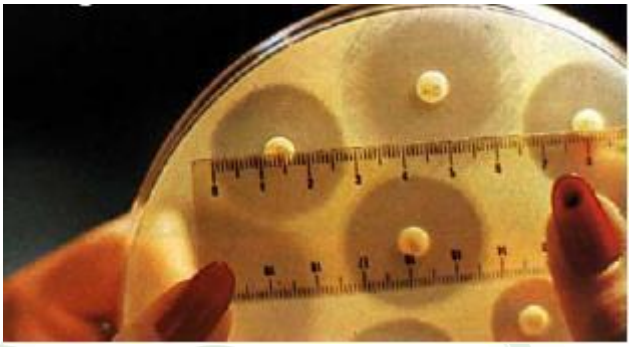
- **Aplicación de los sensidiscos**: Colocar los sensidiscos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Distribuir los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 7 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

- **Incubación**: Incubar lar placas en posición invertida a 36-38°C durante 18 a 24 horas.

- **Lectura de las placas e interpretación de los resultados:** Medir los diámetros de las zonas de

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador. Observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo.



- En los medios suplementados con sangre, las zonas son medidas en la parte superior de la superficie del agar y retirando la tapa. Tener cuidado de no medir la zona de hemólisis sino la de inhibición del crecimiento.

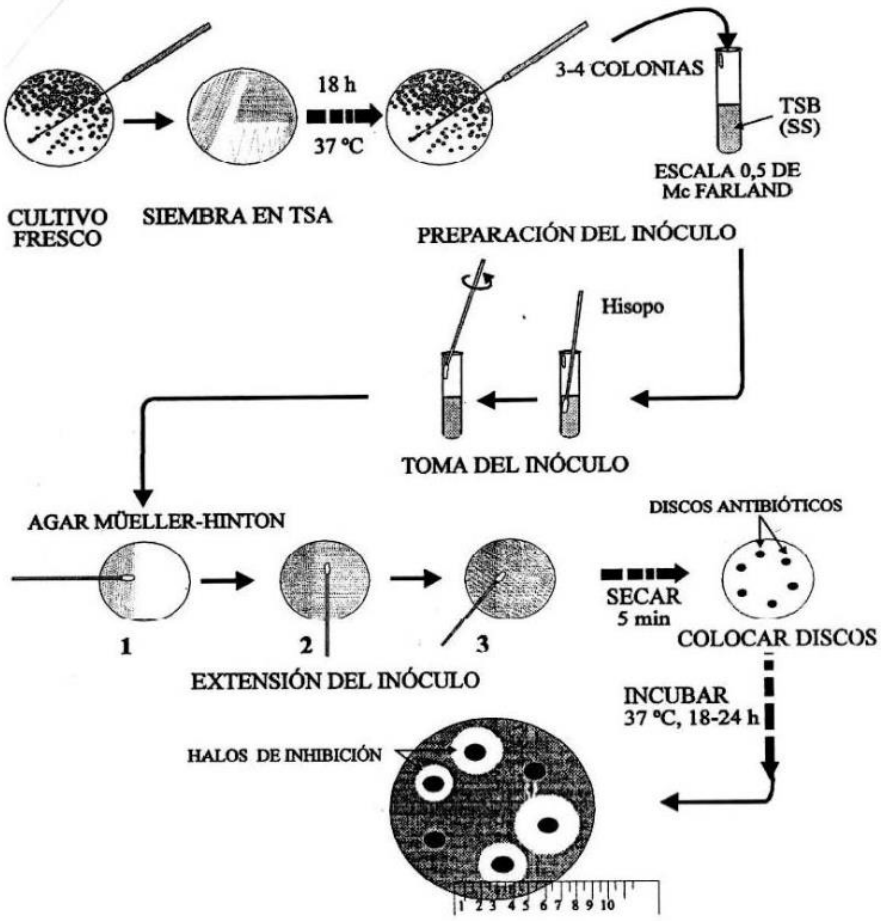


El punto final debe tomarse como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Sin embargo, las colonias mayores que crecerán dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. Algunos *Proteus spp*, debido a su gran movilidad, pueden presentar un velo de invasión o “swarming”

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

dentro de las zonas de inhibición de algunos antibióticos. En estos casos el velo del swarming debe ser ignorado al momento de medir los halos de inhibición. Se pueden obtener resultados de sensibilidad, sensibilidad intermedia o resistencia.

- Registrar los resultados obtenidos en el LBFMT031 Registro de Microbiología.



La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

12.2 Lectura e Interpretación de la zona de inhibición

Lecturas E Interpretación De Las Zonas De Inhibición. ENTE ANTIMICROBIANO	**GENERACION**	**SIGLA**	**POTENCIA**	**RESISTENTE**	**SENSIBLE**
AMIKACINA		AK	30 mcg	≤14 mm	≥17 mm
AMPICILINA		A	10 mcg	≤13 mm (28)*(18)H(16)E(23)Sb	≥17 mm (29)*(22)H(17)E(24)Sb
AMP-SULBACTAM		SAM	10/10 mcg	≤11 mm (19)H	≥15 mm (20)H
AMOXICILINA		AX	25 mcg	≤13 mm	≥17 mm
AMOX- AC. CLAVULANICO		AMC	20/10 mcg	≤13 mm (19) * (19)H	≥18 mm (20) *(20) H
AMOX-SULBACTAM		SO	10/10 mcg	≤13 mm (19) * (19)H	≥18 mm (20) *(20) H
ACIDO NALIDIXICO		W	30 mcg	≤13 mm (25) Nm	≥19 mm (26) Nm
ACIDO OXOLINICO		O	2 mcg	≤10 mm	≥11 mm
ACIDO PIPEMIDICO		PI	20 mcg	≤13 mm	≥19 mm
AZITROMICINA		AZT	15 mcg	≤13 mm (11)H(19) Nm	≥18 mm (12)H(20) Nm
AZTREONAM		AZ	30 mcg	≤15 mm (25)H	≥22 mm (26)H
CEFADROXILO	(1)	CPH	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFACLOR	(2)	FAC	30 mcg	≤14 mm (16)H	≥18 mm (20)H
CEFALEXINA	(1)	CN	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFALOTINA	(1)	CF	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFAZOLINA	(1)	CEZ	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFAMANDOL	(2)	CMA	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFEPIME	(4)	CPM	30 mcg	≤14 mm (30)N(25)H(21) Sv (23) Sb	≥18 mm (31)N(26)H(24) Sv,Sb
CEFIXIMA	(3)	CFM	5 mcg	≤15 mm (20)H(30)N	≥19 mm (21)H(31)N
CEFOPER-SULBACTAM	(3)	SFP	30/75 mcg	≤15 mm	≥21 mm
CEFOTAXIMA	(3)	CTX	30 mcg	≤14 mm (25)H(30)N(23) Sb (25) Sv(33)Nm	≥23 mm (26)H(31)N(24)Sb(28)Sv(34)Nm
CEFOXITINA	(2)	CXA	30 mcg	≤14 mm(21)A,L (23)N(24)**	≥18 mm(22)A,L(28)N(25)**
CEFPROZIL	(2)	CPR	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFRADINA	(1)	CD	30 mcg	≤14 mm	≥18 mm
CEFTAZIDIMA	(3)	CAZ	30 mcg	≤14 mm (25)H(30)N(17)B	≥18 mm (26)H(31)N(21)B

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Lecturas E Interpretación De Las Zonas De Inhibición. ENTE ANTIMICROBIANO	**GENERACION**	**SIGLA**	**POTENCIA**	**RESISTENTE**	**SENSIBLE**
CEFTRIAXONA	(3)	CTR	30 mcg	≤13 mm (25)H (24)Sv(23)Sb(34)N(33)Nm	≥21 mm (26)H(27)Sv(24)Sb(35)N(34)Nm
CEFUROXIMA i v	(2)	CXM	30 mcg	≤14 mm (16)H(25)N	≥18 mm (20)H(31)N
CIPROFLOXACINO		CIP	5 mcg	≤15 mm (20)H(27)N(32)Nm	≥21 mm (21)H(41)N(21)E(35)Nm
CLARITROMICINA		CLR	15 mcg	≤13 mm (10)H (16),S,Sv	≥18 mm (13)H (21),S,Sv
CLINDAMICINA		Da	2 mcg	≤14 mm (15)S,Sv	≥21 mm (19)S,,Sv
CLORANFENICOL		C	30 mcg	≤12 mm (25)H(20)$(17)S,Sv,Sb(19)Nm	≥18 mm (29)H(21)$,S,Sv,Sb(26)Nm
CLOXACILINA		CX	1 mcg	≤10 mm	≥13 mm
COLISTIN		CL	10 mcg	≤10 mm	≥11 mm
DICLOXACILINA		DX	1 mcg	≤10 mm	≥13 mm
DOXICICLINA		DXS	30 mcg	≤10 mm (9)Ac(12)*,E	≥14 mm (13)Ac(16)*,E
ENOXACINO		E	10 mcg	≤14 mm (31)N	≥18 mm (36)N
ERITROMICINA		EM	15 mcg	≤13 mm (15)S,,Sv	≥23 mm (21)S,Sv
ERTAPENEM		ETP	10 mcg	≤15 mm (18)H	≥19 mm (19)H
ESTREPTOMICINA		S	10 mcg	≤11 mm	≥15 mm
ESTREPTOMICINA 300		SE	300 mcg	≤6 mmE	≥10 mmE
FOSFOMICINA		FO	200 mcg	≤12 mm	≥16 mm
FURAZOLIDONA		FZ	100 mcg	≤14 mm	≥17 mm
GENTAMICINA		GE	10 mcg	≤12 mm	≥15 mm
GENTAMICINA 120		G	120 mcg	≤ 6 mmE	≥10 mmE
IMIPENEM		IPM	10 mcg	≤13 mm (15)H	≥16 mm(16)H
KANAMICINA		K	30 mcg	≤13 mm	≥18 mm
LEVOFLOXACINO		LVX	5 mcg	≤13 mm (16)H(15)*	≥17 mm(19)*
LINCOMICINA		L	2 mcg	≤16 mm	≥21 mm
LINEZOLID		LZD	30 mcg	≤20 mmE	≥21 mm (23)E
MEROPENEM		MRP	10 mcg	≤13 mm (19)H(15)B(29)Nm	≥16 mm(20)H(20)B(30)Nm
MINOCICLINA		M	30 mcg	≤12 mm(25)Nm(14)B,Sm,*,E	≥16 mm(26)Nm(19)B,Sm,*,E
MOXIFLOXACINO		MXF	5 mcg	≤20 mm (*)(17)H(14)$	≥24 mm (*)(18)H(18)$
NEOMICINA		N	30 mcg	≤12 mm	≥17 mm
NITROFURANTOINA		NIT	300 mcg	≤14 mm	≥17 mm
NORFLOXACINO		NOR	10 mcg	≤12 mm	≥17 mm

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Lecturas E Interpretación De Las Zonas De Inhibición. ENTE ANTIMICROBIANO	**GENERACION**	**SIGLA**	**POTENCIA**	**RESISTENTE**	**SENSIBLE**
OFLOXACINO		FLX	5 mcg	≤12 mm (24)N(14)*(15)H	≥16 mm (31)N(18)*(16)H
OXACILINA		OX	1 mcg	≤19 mm$ (10)A(17)**	≥20 mm $(13)A(18)**
PENICILINA		P	10 UOF	≤19 mm$ (28)*(26)N(14)E(23)Sb	≥20 mm$ (29)*(47)N(15)E(24)Sb
PIPERACILINA		PE	100 mcg	≤17 mm	≥21 mm (18)P
PIPERAC/TAZOBACTAM		TZ	100/10 mcg	≤17 mm (20)H	≥21 mm H (18)P(18)*
POLIMIXINA B		PB	300 U	≤11 mm	≥12 mm
RIFAMPICINA		R	5 mcg	≤16 mm(19)Nm	≥20 mm (19)$(25)Nm
ROXITROMICINA		RXT	15 mcg	≤13 mm	≥23 mm
SULFATRIMETOPRIM		SX	25 mcg	≤10 mm (15)$(25)Nm	≥16 mm (19)$(30)Nm
SULFONAMIDA		SF	250 mcg	≤12 mm	≥17 mm
TEICOPLANINA		TEI	30 mcg	≤10 mm	≥14 mm
TETRACICLINA		Te	30 mcg	≤11 mm (18)S,,Sv(30)N(25)H(14)*,E,V	≥15 mm (23)S,,Sv(38)N(29)H(19)*,E,V
TOBRAMICINA		TB	10 mcg	≤12 mm	≥15 mm
TRIMETOPRIM		TMP	5 mcg	≤10 mm	≥16 mm
VANCOMICINA		VA	30 mcg	≤16 mm(14)E	≥17 mmS,E

12.3 Selección De Antibióticos

- Los antimicrobianos de la misma clase pueden tener actividades in-vitro similares frente a los patógenos bacterianos seleccionados. Por lo anterior se debe seleccionar un antimicrobiano representativo que permita pronosticar la sensibilidad de otros miembros de la misma clase

- Ciertos microorganismos pueden ser intrínsecamente resistentes a clases de antimicrobianos concretas; por tanto, es innecesario usar sensidiscos de antibióticos para los cuales el microorganismo aislado es resistente. Debe determinarse el tipo de resistencia intrínseca para dichos microorganismos bien sea a partir de la literatura científica o a través de prueba.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

12.4 Sensidiscos Más Usados En Veterinaria Y Su Espectro

ANTIMICROBIANO	GRAM POSITIVO	GRAM NEGATIVO
ACIDO NALIDIXICO	No	SI
AMPICILINA	SI	SI
BACITRACINA	SI	No
CEFALOTINA	SI	SI
CLORANFENICOL	SI	SI
CLOXACILINA	SI	No
COLISTIN	No	SI
ENROFLOXACINA	SI	SI
ERITROMICINA	SI	No
ESTREPTOMICINA	SI	SI
FOFOMICINA	SI	SI
GENTAMICINA	No	SI
KANAMICINA	SI	SI
LINCOMICINA	SI	SI
NEOMICINA	SI	SI
NITROFURANTOINA	SI	SI
OXACILINA	SI	No
PENICILINA	SI	No
PENICILINA G	SI	No
POLIMIXINA B	No	SI
RIFAMPICINA	SI	No
SULFASOXASOLE	SI	SI
TETRACICLINA	SI	SI
TRIMETOPRIM	SI	SI
TYLOSIN	SI	SI
VANCOMICINA	SI	No

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

13. CULTIVO DE HONGOS

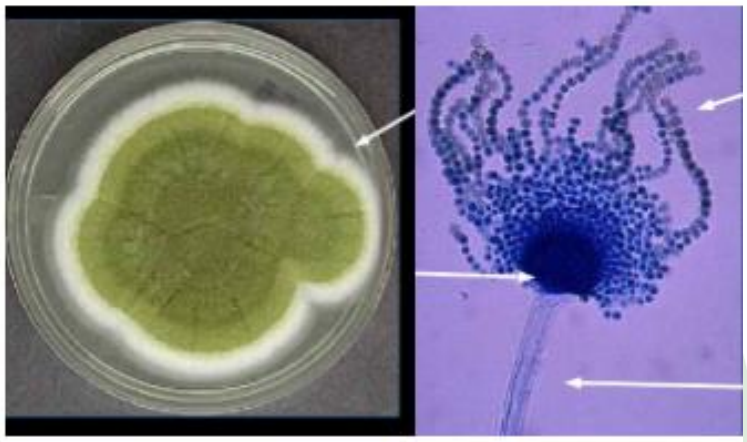
TÉCNICA: CULTIVO DE HONGOS

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	RANGO DE MEDICIÓN	DURACIÓN DEL ENSAYO / PRUEBA
Raspados de piel, fluidos, secreciones y excreciones de cualquier especie animal.	Determinación directa de hongos en muestras biológicas de raspados de piel, fluidos, secreciones, excreciones.	Cultivo e identificación	Hongos que crezcan en Agar Sabouraud	22 días

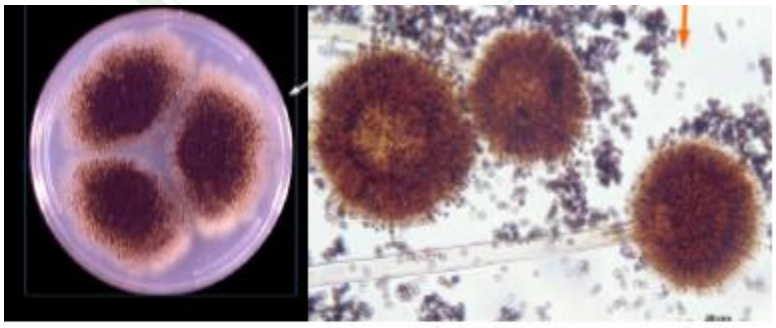
- Atemperar a 18-25°C una caja de Agar Sabouraud.
- Marcar la caja de agar con el número de caso asignado y la identificación de la muestra.
- Independientemente del tipo de muestra (pelo, escamas de piel entre otras) se debe tomar una parte de la misma frente al mechero o en la Cabina de Seguridad Biológica con ayuda de un asa micológica y clavar en el agar asegurándose que no se desprenda del mismo.
- Tapar la caja y sellarla con cinta de enmascarara posteriormente incubar a 18-25°C durante 21 días.
- De presentarse crecimiento se tomará una parte de la colonia teniendo en cuenta de tomar de la parte externa del hongo, se colocará sobre una lámina con una gota de azul de lactofenol, en el caso de presentar crecimiento de hongos filamentosos se realiza método de scotch tape, el cual consiste en colocar suavemente cinta adhesiva sobre la superficie del hongo y luego ésta se deposita en una lámina portaobjetos, donde previamente se ha vertido una gota de azul de lactofenol.
- Identificar bajo el microscopio el género de hongos que presenta crecimiento, discriminando género y de ser posible género y especie.
- **Interpretación**: Un cultivo **negativo** es aquel en el cual no se evidencia crecimiento de colonias de hongos después de 21 días de incubación. Un cultivo **positivo** es aquel en el que se evidencian colonias hongos en los lugares de siembra de las muestras. Si se observa crecimiento de hongos en lugares diferentes a la inoculación de las muestras estos deben ser considerados contaminación.
- A continuación, se observan imágenes de algunos hongos en su presentación macroscópica y microscópica

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

✓ **Aspergillus flavus**



✓ **Aspergillus Níger**

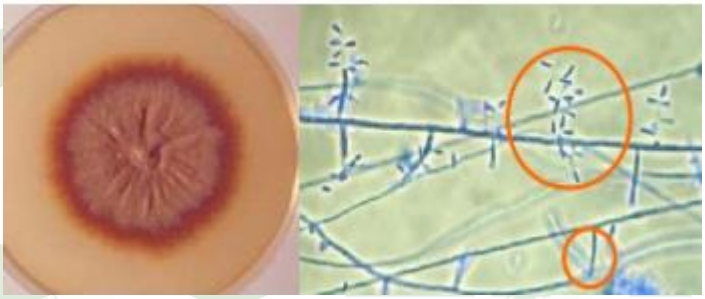


✓ **Aspergillus fumigatus**

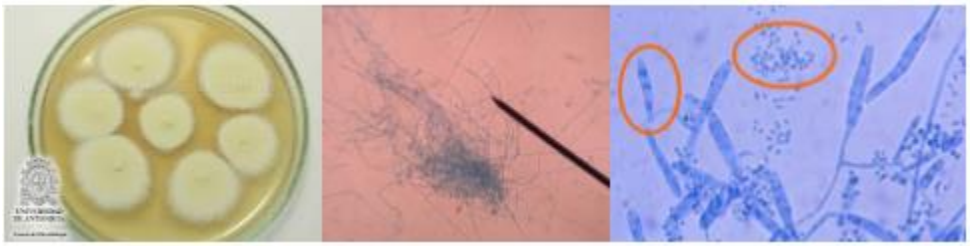
La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



✓ **Trichophyton rubrumm**

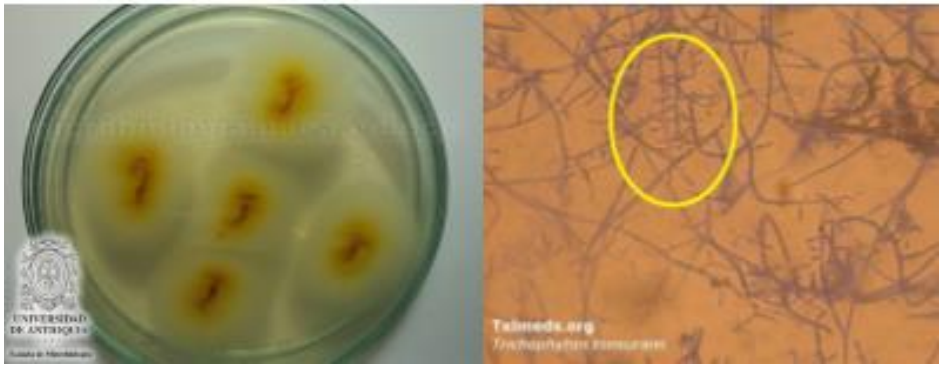


✓ **Trichophyton mentagrophytes**

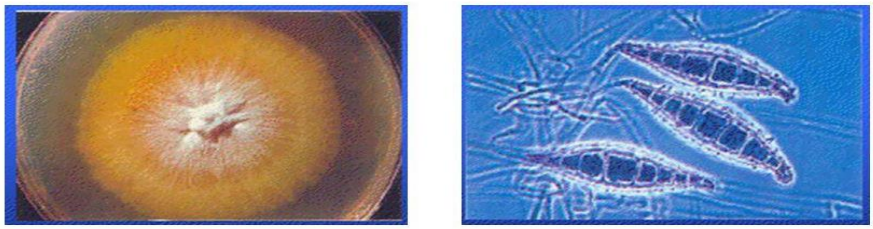


✓ **Trichophyton tonsurans**

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



- ✓ **Microsporum canis**



- ✓ **Epidermophyton floccosum**

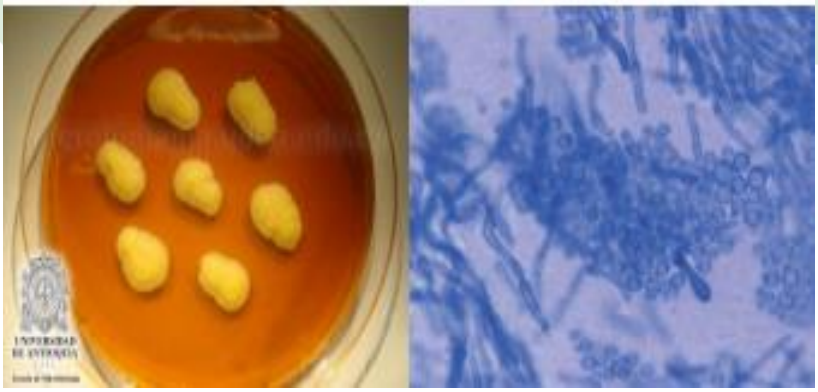


La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

✓ **Cándida albicans**



✓ **Malassezia**



13.1 Aseguramiento de la validez de los resultados

Realizar la verificación del método de acuerdo con el LBPOE009 Aseguramiento de la Validez de los Resultados. Realizar la supervisión de los métodos cada vez que ingrese un nuevo analista y según el DEFMT014 Plan de

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Trabajo Sistema de Gestión y registrarla en el LBFMT095 Supervisión Métodos Analíticos.
Si se evidencian servicios no conformes durante la ejecución del ensayo, se debe registrar en el campo "Observaciones" de las hojas de trabajo y dejar evidencia diligenciando el LBFMT026 Registro y Tratamiento de SNC.

14. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha de Revisión	Versión	Descripción del cambio	Responsable
2013-02-09	001	LBINS031: Aclaración formato de consignación de resultados Num 1,8	CYC
2013-02-09		LBINS032: Aclaración código registro numeral 1,14	CYC
10/09/2010		LBINS033: Complementación instrucción pág. 1	CYC
Marzo 24 de 2012		LBINS039: Se incluye la preparación de soluciones	DS
2013-02-09		LBINS040: Aclaración código formato de consignación de datos	CYC
2013-02-09		LBINS041: Se agrega núm. 1,9	CYC
2014-03-15	002	LBINS031: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
2014-03-15		LBINS032: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
20113-02-09		LBINS033: Aclaración código formato registro datos	CYC
Febrero 9 de 2013		LBINS039: Se cambia razón social de la empresa, se excluye preparación de soluciones	SLC
2014-03-15		LBINS040: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
2014-03-15		LBINS041 : Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

2014-10-11	003	LBINS031: Se realiza revisión del instructivo se incluye en el numeral 1.5. la obligatoriedad de sellar con cinta y en el numeral 1.6. se aclara el caso que se presenten hongos; actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	PAG
2014-10-11		LBINS032: Se realiza revisión del instructivo se incluye Si la muestra es orina, la forma de sembrarlo es en primera instancia tomar el asa (la cual contiene el inoculó), trazar una línea vertical a lo largo de la caja de agar sangre/agar MacConkey. Acto seguido, distribuir el inoculó de forma horizontal (este método de siembra facilita el recuento de unidades formadoras de colonia), en el numeral 1.12 se incluye Las pruebas bioquímicas son realizadas mediante el sistema enteropluritest, el cual permite la identificación exacta del microorganismo aislado. actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	PAG
2014-03-15		LBINS033: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
2014-03-15		LBINS039: Se incluye la información referente a los equipos, insumos, elementos de protección asociados a la técnica	LFC
2014-10-11		LBINS040: Se realiza revisión del instructivo se actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	PAG
2014-10-11	004	LBINS033: Se realiza revisión del instructivo se actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	KAM

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

2014-10-11		LBINS039: Se realiza revisión del instructivo se actualizan los EPP excluyendo los cargos. Se incluye la identificación de la sustancia o elemento a ensayar, descripción del ensayo, método, rango de medición y duración de la prueba.	PAG
Agosto 3 de 2015	005	Se crea el documento integrando los instructivos de Cultivo Campylobacter, Instructivo Para Cultivo y Lectura de Trichomonas sp, LBINS031 Instructivo Cultivo Hongos, LBINS032 Instructivo Cultivo Gérmenes comunes, LBINS033 Ins Hemocultivo, LBINS039 Preparación de medios de cultivo, LBINS040 Instructivo Coloración de Gram, LBINS041 Instructivo Antibiograma, se define continuar el control de cambios a partir de la mayor versión que poseen los documentos que fueron integrados. Se incluye en el documento el histórico del control de cambios.	LFC
Octubre 28 de 2015	006	Se incluye Introducción, Propósito, Alcance Referencias Bibliográficas, Definiciones, Recursos Para La Realización De Los Ensayos	CYC
Enero 5 de 2016	007	Se realizan cambios y actualización a los métodos utilizados	KAM
Enero 2 de 2018	008	Se actualiza numeral 6 Recursos necesarios para realización de análisis. Se actualiza forma de realizar control de calidad de Coloración de Gram. Se incluye apartado de aseguramiento de calidad para todos los procedimientos. Inclusión de antibióticos para antibiogramas en aislamientos a partir de leche.	Yanira Chaparro – Quality Control
Julio 02 de 2020.	009	Se incluyen algunos términos en las definiciones (medio de cultivo, coloración, colonia, espora, cepa, flagelo). Se incluye un nuevo texto en la bibliografía. Se eliminan del listado algunos implementos y medios que ya no se usan como la malla de asbesto, el trípode del mechero de Bunsen, los sobres de microaerofilia, medio líquido de Brucella y medio para tricomonas. Se elimina el método de cultivo por Anaerobiosis. Se Actualiza información y gráficas de	Jeanethe Rojas R. Gerencia de Calidad. Sphefanía Garay Castro Dir. Grandes Especies

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

		algunas pruebas bioquímicas. Se eliminan las tablas de antibióticos para la distribución de la glándula mamaria por considerarse innecesarias. Se elimina el Hemocultivo. Se amplía la información de susceptibilidad a antimicrobianos para la identificación de bacterias. Se incluye la coloración de Gram. Se actualiza el esquema de los cocos gramnegativos, añadiendo la identificación de *Moraxella*. En el 7.1.1. se elimina la información de Leptospira ya que se tiene un POE independiente para esta información.	
Agosto 5 de 2022	010	Se actualizan las referencias bibliográficas y las definiciones del numeral 5. Se actualiza el numeral 6 “Recursos para la realización de los ensayos”. Se incluye Morfología Bacteriana y Tinciones en el numeral 7. Se actualiza todo el numeral referente a Medios de Cultivo (8). Se actualizan gráficos y contenidos del numeral 9 = Pruebas Bioquímicas de Identificación”. Se elimina la información de enteropluritest y se reemplaza por la de API20E, que es la que usamos actualmente. En el numeral 11 “Flujogramas” se eliminan los esquemas de identificación de bacterias exigentes cuya identificación no realizamos. Se actualiza el ítems de antibiograma y se incluye una imagen de medición del halo de inhibición.	Laura Poveda Mendieta Dir. Científica de Básicas. Jeanethe Rojas R. Gerente de Calidad.
Marzo 28 de 2024	012	Se agrega proceso de MALDI-TOF para identificación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos.	Karen Moreno

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

1. gINTRODUCCIÓN

El Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab tiene implementadas pruebas por diferentes métodos inmunológicos de ensayo que contribuyen a facilitar el diagnóstico de enfermedades de importancia en sanidad y producción animal.

La realización de pruebas inmunológicas puede ser utilizada para varios propósitos: diagnóstico, prevención, vigilancia activa, elección de momentos de vacunación, seguimiento de programas vacunales, determinación de estatus sanitarios, calcular indicadores de protección, entre otros.

2. PROPÓSITO

Unificar las instrucciones de realización de métodos de ensayo de inmunología realizados en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab en el área de Básicas.

3. ALCANCE

Aplica para la ejecución de los ensayos descritos en el presente procedimiento, de acuerdo con los numerales 7.2 Selección, Verificación y Validación de Métodos y 7.7 Aseguramiento de la Validez de Los Resultados de la NTC-ISO/IEC 17025:2017.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, L. y col. Universidad de León – Universidad Santiago de Compostela Universidad de Zaragoza Patología médica veterinaria. Sangre y sistema inmunitario, 2003
- BIONOTE. Kit de Prueba Rápida Anigen para Anticuerpos contra C. Brucella
- BIONOTE. Anigen Rapid CDV Ag Test Kit Doc. No.: I 1103-4E Fecha de elaboración: Mar. 04,
- BIONOTE. Kit del Test Rápido Anigen para E. canis Doc. No.: 2105-1 Fecha de elaboración: Abril, 2009
- BIONOTE. Kit de Prueba Rápido Anigen para Ag FeLV/Ab FIV Doc. Nº: 12-04-2 Revisión: Jane. 8, 2009
- BIONOTE. Anigen Rapid CPV Ag Test Kit
- Clinton, N.J. Methods in molecular biology. Methods Mol Biol. 2015; 1318:61-7. doi: 10.1007/978-1- 939-2742-5_6.
- Gómez, Esperanza y Col. Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunológicas. Recursos Educativos Serie Veterinaria 3(15):94-121, 2011 ISSN: 1989-5003
- OIE. MANUAL DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y DE LAS VACUNA PARA LOS ANIMALES TERRESTRES 2013. Organización mundial de sanidad animal (OIE)
- Universidad Autónoma del Estado de México. Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología. Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Actualización 2013. Recuperado en http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_974_MP%20Virolog%C3%ADa.pdf

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

5. DEFINICIONES

- **ANTICUERPOS:** Proteínas producidas por el sistema inmunológico para identificar y neutralizar las sustancias dañinas y/o extrañas a un individuo (antígenos). Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B.

- **ANTICUERPOS MONOCLONALES**: anticuerpo homogéneo producido por un clon de células. Este clon está derivado de una célula híbrida, creada a partir de la fusión de una sola célula madre del sistema inmune y una célula plasmática tumoral. Este clon de linfocitos B fabrica anticuerpos idénticos y específicos para un antígeno. Con esto se consigue producir anticuerpos monoclonales, muy útiles y utilizados en biomedicina y en biología molecular. En medicina se utilizan, por ejemplo, para detectar la presencia y cantidad de una sustancia en la sangre.

- **ANTÍGENO:** Sustancia extraña y/o dañina que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.

- **CONJUGADO**: Reactivo que se forma por unión covalente entre dos moléculas, como la fluoresceína unida a una molécula de inmunoglobulina, produciendo un producto coloreado que es detectado visualmente o por un espectrofotómetro.

- **EPÍTOPO**: Los epítopos o determinantes antigénicos son cada uno de los sitios de una macromolécula que son reconocidos individualmente por un anticuerpo específico o por un receptos de linfocitos t (TCR). Son las regiones inmunológicamente activas de un inmunógeno o sea las que se unen a un receptor de linfocitos o a un anticuerpo libre.

- **INMUNIDAD CELULAR**: Proceso de respuesta inmunológica en la que intervienen las células inmunológicamente competentes: fagocitos, células T y macrófagos. El sistema actúa fagocitando la célula infectada y destruyendo el parásito y la célula hospedadora.

- **INMUNIDAD HUMORAL**: Principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, en el cual, los componentes del sistema inmunitario que atacan a los antígenos, no son las células directamente sino son macromoléculas, como anticuerpos o proteínas del sistema del complemento

- **INMUNOLOGÍA:** Estudio de las respuestas inmunes y sus consecuencias.

- **NITROCELULOSA:** Es un sólido parecido al algodón o un líquido gelatinoso ligeramente amarillo o incoloro, tiene muchos usos, entre ellos, es empleado como sustrato principal (considerado papel) en los test de diagnóstico rápido.

- **RESPUESTA INMUNE:** Conjunto de mecanismos fisiológicos que permiten al animal reconocer sustancias extrañas a su organismo, neutralizarlas y eliminarlas o metabolizarlas, con o sin lesión de los tejidos

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- **SEROCONVERSIÓN:** Demostración de la presencia de anticuerpos específicos para un antígeno concreto en el suero de un individuo, previamente negativo para dicha especificidad antigénica.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

6. INMUNOCROMATOGRAFÍA

La Inmunocromatografía o Inmunomigración es una prueba rápida, sensible y de fácil realización. Para detección de antígenos utiliza anticuerpos marcados con metales pesados: selenio (azul) y oro coloidal (rosa). Se basa en la migración de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa. La muestra es añadida en la zona del conjugado, el cual está formado por un anticuerpo específico contra uno de los epítopos del antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el antígeno problema, éste se unirá al conjugado formando un inmunocomplejo y migrará a través de la membrana de nitrocelulosa. Si no se forman inmunocomplejos migrarán el conjugado y la muestra sin unirse. La zona de captura está formada por un segundo anticuerpo específico contra otro epítopo del antígeno. Al llegar la muestra a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y conjugado quedarán retenidos y la línea se coloreará en este caso como rosa o azul (muestras positivas). En el caso contrario las muestras son negativas.
La zona control está formada por un tercer anticuerpo que reconoce al reactivo de detección. Cuando el resto de muestra alcanza esta zona, el anticuerpo se unirá al conjugado libre que no ha quedado retenido en la zona de captura. Esta línea es un control de que el ensayo ha funcionado bien, porque se colorea siempre, con muestras positivas y negativas

Las muestras (diluidas o no) pueden ser sangre, suero sanguíneo, saliva, orina, etc. También se puede usar esta prueba para detectar anticuerpos, en este caso el conjugado será un antígeno marcado, en la zona de captura de inmunocomplejo habrá un anticuerpo anti anticuerpo a detectar, en la zona de control se incluirá un anticuerpo anti reactivo de detección.

Para la realización de este ensayo es necesario seguir las siguientes instrucciones:

- **NO OLVIDE MARCAR TODOS LOS ELEMENTOS QUE UTILICE DURANTE LA PRUEBA:** Esto incluye recipientes para dispensación / preparación de reactivos, muestras, placas de predilución y placas recubiertas de antígeno.
- Para el proceso se deben seguir las instrucciones del fabricante.
- Se deben registrar los resultados en el registro manual correspondiente. Consignar los resultados en los registros manuales pertinentes cuando así se requiera.

INTERPRETACIÓN: Se considera reacción POSITIVA cuando se evidencian dos bandas (muestra y control).
Se considera reacción Negativa cuando se observa banda solo en la zona de control

7.1. Aseguramiento De La Calidad

- **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DEL MÉTODO**: Los resultados son válidos solo cuando la zona de control tiene la banda de color claramente visible.
- Realizar registro de control de la prueba en LBFMT054 Control De Inmunología.
- Cada vez que ingrese un nuevo analista y de acuerdo a la DEFMT014 Plan de Trabajo Sistema de Gestión, la supervisión de métodos se debe realizar y registrar en el LBFMT095 Supervisión Métodos Analíticos e informar a la Gerencia General que realizará la autorización siguiendo lo definido en el THPOE001 Relación Contractual.
- Si se evidencian servicios no conformes durante la ejecución del ensayo, se debe registrar en el campo “Observaciones” de las hojas de trabajo la fecha de registro en el LBFMT026 Registro y Tratamiento de

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

SNC.

7.2. Recursos Para La Realización De Los Ensayos

7.2.1. Equipos

- Micropipeta mono canal de volumen ajustable en el rango hasta 100 ul
- Termómetros para medición de temperatura ambiente y para medios isotermos.
- Cronómetro con alarma audible

7.2.2. Insumos

- Puntas nuevas para pipetas de 5-200ul
- Pipetas Pasteur

7.2.3. Reactivos:

- Kit de reactivo de cada ensayo: con certificados de análisis y liberación de lote por parte del ICA para el ensayo Brucella Elisa Indirecta

7.2.4. Material De Referencia:

- Sueros de Referencia Secundarios, Positivo y Negativo
- Si no hay disponibilidad de Sueros de Referencia Secundarios, de manera opcional utilizar sueros de referencia de trabajo preparados en el laboratorio.

7.2.5. Elementos De Protección Personal

- Uniforme
- Guantes de látex/ Nitrilo
- Gorro
- Tapabocas
- Zapato antideslizante
- Careta

7.3. BRUCELLA CANIS

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo canino	Determinación de anticuerpos anti Brucella canis en muestras biológicas de suero sanguíneo por Inmunocromatografía	BIONOTE. Kit de Prueba Rápida Anigen para Anticuerpos contra C. Brucella

a. Descripción

La Brucelosis canina es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria del género Brucella canis. El Kit de prueba Rápida Anigen para anticuerpos de Brucella canis es un inmunoensayo cromatográfico para la detección

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

cualitativa de anticuerpos de Brucella canis en sangre completa, plasma o suero. El Kit del Prueba Rápida Anigen para anticuerpos de Brucella canis presenta las letras T y C que significan “Línea del Test” y “Línea de Control” en la superficie del kit. Tanto la “Línea del Test” como la “Línea de Control” no son visibles antes de haber aplicado las muestras. La “Línea de Control” se utiliza para control procedimental. La línea de control deberá aparecer en todo momento si el procedimiento se efectúa correctamente y si los reactivos de control del test están funcionando bien. En la ventana de resultados se hará visible una “Línea del Test” de color púrpura si existen suficientes anticuerpos de Brucella canis en la muestra. En el test se utilizan antígenos de Brucella canis especialmente seleccionados, tanto como materiales de captura como materiales detectores. Ello permite identificar los anticuerpos contra *Brucella canis* en las muestras con una alto grado de exactitud.

b. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

El Kit de Prueba Rápida Anigen para anticuerpos contra Brucella canis debe conservarse a temperatura ambiente. El kit del test es sensible a la humedad y al calor. Efectúe el test inmediatamente después de retirar el dispositivo del test de la bolsa de papel aluminio. No use el kit después de la fecha de vencimiento.

c. Preparación De Las Muestras

- [Sangre completa] Recolecte la sangre completa usando un anticoagulante apropiado. Use la sangre completa a más tardar 1 día después de recolectada. No use sangre de hemólisis.

- [Suero o Plasma] Centrifugue la sangre completa para obtener la muestra de plasma o suero.

- Si las muestras no se someten al test inmediatamente, deben refrigerarse a 2 ~ 8ºC. Para periodos de almacenamiento mayores a 3 días, congele la muestra a - 20℃ o a menor temperatura (suero o plasma). Las muestras deben elevarse a la temperatura ambiente antes de usarse.

- Las muestras que contengan precipitado pueden arrojar resultados de test inconsistentes. Estas muestras deben clarificarse antes de realizar el test. Si los precipitados son atribuibles a contaminación bacteriana la muestra no debe procesarse.

d. Procedimiento

PASO 1. Extraiga el kit del test de la bolsa de papel aluminio y colóquela en una superficie plana y seca.

PASO 2. Recolecte 10 ul de suero, plasma o sangre completa hasta llegar a la línea oscura marcada del tubo capilar.

PASO 3. Agregue lentamente 10 ul de suero al pozo de la muestra con el tubo capilar de la línea marcada para un volumen de 10 ul y a continuación agregue 2 gotas (aprox. 60 ul) con el frasco que contienen el buffer del diluyente. Si no se ha observado migración en 1 minuto, agregue una gota más de buffer al pozo de la muestra. Si tras un minuto no se observa migración, agregue una gota más del diluyente de la prueba al pozo de la muestra.

PASO 4. Como los resultados de la prueba, en la ventana de resultados del kit se podrá observar una banda de color púrpura.

PASO 5. Interprete los resultados del test en los siguientes 20 minutos. Por favor no lea el resultado después

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

de transcurridos 20 minutos.

e. Lectura E Interpretación De Resultados

PASO 1. Aparecerá una banda color púrpura en la parte izquierda de la ventana de resultados para indicar que el test está funcionando correctamente. Esta es la línea de Control (C).

PASO 2. La sección derecha de la ventana de resultados indica el resultado del test. Si en la sección derecha de la ventana de resultados aparece una banda de otro color, se tratará de la línea del Test (T).

Negativo: Presencia únicamente de una banda púrpura en la ventana de resultados indica un resultado negativo.

Positivo: Presencia de dos bandas de color (banda "T" y banda "C") en la ventana de resultados, sin importar cuál aparezca primero, indica un resultado positivo.

I**nválido**: Si después de efectuado el test, no aparece la banda púrpura en la ventana de control, el resultado se considera inválido. Es posible que no se hayan seguido correctamente las instrucciones o el test puede haberse deteriorado. Se recomienda volver a efectuar el test para la muestra.

7.4. DISTEMPER CANINO ANTÍGENO

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo o plasma	Determinación de virus de Distemper en muestras biológicas de suero sanguíneo por Inmunocromatografía	BIONOTE. Anigen Rapid CDV Ag Test Kit Doc. No.: I 1103-4E Fecha de elaboración: Mar. 04, 2013

a. Descripción

El kit de prueba rápida Anigen Rapid CDV Ag es un ensayo inmunocromatográfico para la detección cualitativa del antígeno del virus del Moquillo canino en muestras de conjuntiva, orina, suero o plasma. El kit de prueba rápida Anigen Rapid CDV Ag tiene las letras "T" como línea de prueba y "C" como línea control en la superficie del dispositivo, las cuales no son visibles en la ventana de resultados antes de aplicar cualquier muestra. La línea control es usada para control del procedimiento. La línea control debe aparecer siempre. Si el procedimiento de prueba es ejecutado adecuadamente y los reactivos de prueba de la línea control están funcionando. Una línea de prueba purpura será visible en la ventana de resultados si hay suficiente antígeno de virus del moquillo canino en la muestra. Se emplean anticuerpos del virus del moquillo canino especialmente seleccionados en la banda de prueba como materiales de captura y detector. Esto permite que el kit de prueba rápida Anigen Rapid CDV Ag identifique el antígeno del virus del moquillo canino en muestras de conjuntiva, orina suero o plasma con un alto grado de exactitud.

b. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

El kit puede ser almacenado a temperatura ambiente (2~30℃) o refrigerado. El kit de prueba es estable hasta la fecha de vencimiento marcada en la etiqueta. NO CONGELAR. No almacenar el kit de prueba expuesto a la luz solar

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

c. Preparación De Las Muestras

PASO 1. La prueba debe ejecutarse en muestras de secreción conjuntiva, orina, suero o plasma.

PASO 2. Después de recolectar la muestra usando un hisopo, la muestra debe ser extraída y analizada inmediatamente.

PASO 3. Si las muestras no son analizadas inmediatamente, deben ser refrigeradas de 2~8℃, para almacenamiento mayor a 48 horas, congele la muestra a - 20℃ o menos.

d. Preparación De Los Reactivos

NO APLICA

e. Procedimiento

PASO 1. Recolecte las muestras de conjuntiva u orina usando el hisopo de recolección pre-humedecido con solución salina. En caso de muestras de suero o plasma, usar el gotero.

PASO 2. Inserte el hisopo en el tubo de muestra que contiene 300µl de diluyente del ensayo.

PASO 3. En caso de muestras de suero o plasma, adicione 2-3 gotas de suero o plasma en el tubo de muestra que contiene 300 µl de diluyente del ensayo usando el gotero.

PASO 4. Mezclar la muestra del hisopo con el diluyente del ensayo para extraer muy bien.

PASO 5. Retire el dispositivo de prueba de la bolsa de aluminio y ubíquelo sobre una superficie seca y plana.

PASO 6. Adicione cuatro (4) gotas de la mezcla de la muestra al pozo de muestra usando el gotero, gota a gota y lentamente

PASO 7. A medida que la prueba comienza a correr, verá un color púrpura moverse a través de la ventana de resultado en el centro del dispositivo. Si la migración no ha aparecido después de 1 minuto, adicione una gota más de la mezcla de la muestra al pozo de muestra. Interprete los resultados de la prueba de 5-10 minutos.

f. Lectura E Interpretación De Resultados

Una banda de color aparecerá en la sección izquierda de la ventana de resultados demostrando que la prueba está funcionando adecuadamente. Esta banda es la banda de control. La sección derecha de la ventana de resultado indica el resultado de la prueba. Si otra banda de color aparece en la sección derecha de la ventana de resultados. Esta banda es la banda de prueba.

Resultado Negativo: La presencia de una banda solamente en la ventana de resultados indica un resultado negativo

Resultado Positivo: La Presencia de dos bandas de color (“T” y “C”) dentro de la ventana de resultados,

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

sin importar cual banda aparezca primero indica un resultado positivo.

Resultado Invalido: Si la banda de color purpura no está visible dentro de la ventana de resultados después de realizar la prueba, el resultado es considerado no válido. Las instrucciones pueden no haberse seguido correctamente o la prueba puede estar deteriorada. Se recomienda analizar nuevamente la muestra.

7.5. EHRLICHIA CANIS

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo o plasma	Determinación de anticuerpos anti Ehrlichia canis en muestras biológicas de suero sanguíneo por Inmunocromatografía	BIONOTE. Kit del Test Rápido Anigen para E. canis Doc. No.: 2105-1 Fecha de elaboración: Abril, 2009

a. Descripción

El kit de prueba Anigen Rapid E. canis Ab es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa de anticuerpos de Ehrlichia canis en suero, plasma o sangre total canina. El kit de prueba Anigen Rapid E. Canis Ac tiene las letras “T” y “C” como línea de prueba y línea control respectivamente sobre la superficie del dispositivo. Estas dos líneas no son visibles en la ventana de resultados antes de la aplicación de cualquier muestra. La línea control es usada como control del procedimiento, y debe aparecer siempre, si el procedimiento de prueba es realizado correctamente y los reactivos de prueba están funcionando. Una línea de prueba púrpura aparecerá en la ventana de resultados si en la muestra hay presencia de anticuerpos contra E. canis. Los antígenos de E. canis especialmente seleccionados son usados en la banda de prueba como materiales de detección y captura. Estos permiten al kit de prueba Anigen Rapid E. canis Ac identificar los anticuerpos de Ehrlichia canis en muestras de suero, plasma o sangre total canina con un alto grado de exactitud.

b. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

El kit puede ser almacenado a temperatura ambiente (2~30℃) o refrigerado. El kit es estable hasta la fecha de vencimiento marcada sobre la etiqueta del empaque. NO CONGELAR. Evitar el almacenamiento del kit de prueba expuesto a la luz directa del sol.

c. Preparación De Las Muestras

La prueba debe ser realizada usando suero, plasma o sangre total.

[Sangre Total] Recolecte una muestra de sangre con anticoagulante, ya sea EDTA, heparina o citrato

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

usando los procedimientos estándar del laboratorio clínico. Las muestras de sangre total anticoagulada deben ser analizadas dentro de las 24 horas desde la extracción. Si se estima alguna demora, las muestras deben ser almacenadas ya sea en hielo o refrigeradas (2~7℃), pero no deben ser congeladas. Si no pueden ser analizadas las muestras de sangre total anticoagulada dentro de este periodo de tiempo, se recomienda separar el plasma mediante centrifugación y almacenar como se describe en la siguiente sección.

[Plasma] Recolecte una muestra de sangre con anticoagulante, ya sea EDTA, heparina o citrato usando los procedimientos estándar del laboratorio clínico. Separar el plasma por centrifugación. Las muestras de plasma pueden ser almacenadas refrigeradas (2~7℃) por hasta 72horas, para periodos de almacenamiento más largos, congele a -20℃ o menos en viales con sellos herméticos.

[Suero] Recolecte y prepare la muestra de suero usando los procedimientos estándar del laboratorio clínico. Las muestras de suero pueden ser almacenadas refrigeradas (2~7℃) por hasta 72 horas, para periodos de almacenamiento más largos, congele a -20℃ o menos en viales con sellos herméticos.

d. Preparación De Los Reactivos

NO APLICA

e. Procedimiento

(Muestras de suero y plasma)

PASO 1. Retire el kit de prueba de la bolsa de aluminio y ubíquelo sobre una superficie plana y seca.
2) Adicione 10ul de suero, plasma al pozo marcado con la letra “S” sobre el dispositivo de prueba con un tubo capilar y espere 1 minuto, luego adicione 3 gotas del búfer revelador dentro del pozo para el búfer.
3) Para los resultados de prueba, se observará la banda púrpura en la ventana de resultados del dispositivo. Interprete los resultados de prueba a los 20 minutos. No interpretar después de 30 minutos.

(Muestras de sangre total)

PASO 1. Retire el kit de prueba de la bolsa de aluminio y ubíquelo sobre una superficie plana y seca.

PASO 2. Dispensar 3 gotas de diluyente de sangre total dentro del tubo de prueba para la dilución de la sangre total. Adicionar 1 gota (30ul) de muestra de sangre total con un gotero desechable y mézclelos por 1 minuto.

PASO 3. Adicionar 10ul de la mezcla de muestra al pozo de muestra marcado con la letra “S” del dispositivo de prueba con un tubo capilar y espere 1 minuto.

PASO 4. Adicione 3 gotas del búfer revelador dentro del pozo para el búfer.

PASO 5. Para los resultados de prueba, se observará la banda púrpura en la ventana de resultados del dispositivo. Interprete los resultados de prueba a los 20 minutos. No interpretar después de 30 minutos.

f. Lectura E Interpretación De Resultados

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Una banda de color aparecerá en la sección izquierda de la ventana de resultados para mostrar que la prueba está funcionando adecuadamente. Esta banda es la banda control. La sección derecha de la ventana de resultados indica el resultado de la prueba. Si aparece otra banda de color en la sección derecha de la banda de resultados, esta es la banda de prueba.

Resultado Negativo La presencia de solamente una banda (“C”) dentro de la ventana de resultados indica un resultado negativo.

Resultado Positivo La presencia de dos bandas de color (“T” y “C”) dentro de la ventana de resultados, sin importar cual banda aparece primero indica un resultado positivo.

Resultado Invalido Si no hay banda de color púrpura (“C”) dentro de la ventana de resultados después de realizar la prueba, el resultado se considera Inválido. Puede ser que no se siguieron correctamente las instrucciones o que la prueba esté deteriorada. Se recomienda analizar la muestra nuevamente.

7.6. INMUNODEFICIENCIA VIRAL FELINA / LEUCEMIA VIRAL FELINA

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo o plasma felino	Determinación de antígeno de Virus de Leucemia Viral Felina y anticuerpos anti virus de Inmunodeficiencia Felina en muestras biológicas de suero sanguíneo en felinos por Inmunocromatografía	BIONOTE. Kit de Prueba Rápido Anigen para Ag FeLV/Ab FIV Doc. N° 12-04-2 Revisión: Jane. 8, 2009

a. Descripción

El Kit de Prueba Rápido Anigen para Ag FeLV/Ab FIV es un inmunoensayo por cromatografía para la detección del antígeno del virus de Leucemia Felina y el anticuerpo contra el virus de inmunodeficiencia Felina en suero, plasma o sangre total felina. El Kit de Rápida Anigen para la detección del Antígeno de virus de leucemia felina/Ac contra el virus de inmunodeficiencia felina, tiene las letras “T” y “C” como Línea de test y Línea control, sobre la superficie del dispositivo. Ninguna de las líneas es visible en la ventana de resultados antes de aplicar las muestras. La línea control es usada para el control del procedimiento, y debe aparecer siempre que el procedimiento se realice apropiadamente y que los reactivos de la línea control estén funcionando. Una línea púrpura se hará visible en la ventana de resultados si se encuentran en la muestra suficiente cantidad de los antígenos o anticuerpos buscados. Tanto el antígeno del virus de Inmunodeficiencia Felina, como el anticuerpo contra el virus de Leucemia Felina especialmente seleccionados son usados en la banda del test como materiales de captura y de detección. Estos permiten que el Kit de Prueba Rápido Anigen para Ag FeLV/Ab FIV sirva para identificar el antígeno del virus de Leucemia Felina y el anticuerpo contra el virus de Inmunodeficiencia Felina en suero, plasma o sangre total de felino con un alto grado de exactitud.

b. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

El kit puede ser almacenado a temperatura ambiente (2 a 30 ºC) o refrigerado. El kit es estable hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta del empaque. NO CONGELE. No lo almacene expuesto a la luz directa. .

c. Preparación De Las Muestras

El test debe ser realizado utilizando suero, plasma o sangre total.

Sangre Total Recoger muestra de sangre anticoagulada con EDTA, Heparina o Citrato usando los procedimientos estándar de laboratorio. Las muestras de sangre total anticoagulada deben ser procesadas antes de 24 horas. Si hay demora, las muestras deben ser almacenadas en hielo o refrigeradas (2 a 7ºC), pero no deben ser congeladas. Si no se pueden procesar en este periodo de tiempo se recomienda separar el plasma por centrifugación y almacenar como se describe en la siguiente sección.

Plasma Recoger una muestra de sangre anticoagulada usando los procedimientos estándares de laboratorio. Separar el plasma por centrifugación. Las muestras de plasma pueden ser almacenadas en refrigeración (2 a 7ºC) por un máximo de 72 horas, para periodos prolongados, congelar a -20 ºC en viales con cierre hermético.

Suero Recolectar y preparar muestras de suero usando los procedimientos estándares de laboratorio clínico. Las muestras de suero pueden ser almacenadas en refrigeración (2 a 7ºC) hasta 7 horas; para periodos más prolongados, congelar a - 20ºC en viales con cierre hermético.

d. Preparación De Los Reactivos

NO APLICA

e. Procedimiento

PASO 1. Sacar el dispositivo del empaque, y colocarlo en una superficie seca y plana.

PASO 2. Usando el tubo capilar dispensador, adicionar 1 gota (aprox. 10µL) del suero, plasma o sangre total felina en el pozo de muestra, luego adicionar 2 gotas (aprox. 60 µL) de diluyente de ensayo.

PASO 3. Una vez el dispositivo comienza a trabajar, se puede observar un color púrpura moviéndose a través de la ventana de resultados en el centro del dispositivo. Si no sucede la migración después de un minuto, adicione una gota más de diluyente en el pozo de muestra.

PASO 4. Interpretar los resultados a los 10 minutos. No interpretar después de los 10 minutos.

f. Lectura E Interpretación De Resultados

- Resultado Negativo La presencia de una sola banda en la ventana de resultados en el área del test FIV Ab y FeLV Ag, indica un resultado negativo.

- Resultado simultáneo positivo en FIV Ab y FeLV. La presencia de dos bandas de color (T y C) en la ventana de resultados de cualquiera de las dos áreas del test, sin importar cual aparece primero, indica

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

un resultado positivo para Ag del virus de leucemia felina y Ac contra el virus de inmunodeficiencia felina simultáneamente.

- Resultado Positivo FIV Ab La presencia de dos bandas de color (T y C) en la ventana de resultados del área del test FIV Ab, y la presencia de solo una banda en el área del test FeLV Ag, sin importar cual aparece primero, indica un resultado positivo para el Antígeno del virus de inmunodeficiencia felina.

- Resultado positivo para FeLV Ag La presencia de dos bandas de color (T y C) en la ventana de resultados del área de FeLV Ag, y la presencia de una sola banda (C) en la ventana de resultados en el área del test FIV Ab, sin importar cual aparece primero, indica un resultado positivo para el Antígeno del virus de Leucemia Felina.

- Resultado Inválido Si no es visible una banda de color púrpura en la ventana después de realizada la prueba, el resultado se considera inválido. Es posible que las instrucciones no se hayan seguido correctamente o que el test esté deteriorado. Se recomienda utilizar otro dispositivo para correr la muestra.

7.7. PARVOVIRUS CANINO ANTÍGENO

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Materia fecal canina	Detección cualitativa de antígeno de Parvovirus canino en muestras biológicas de materia fecal en caninos por Inmunocromatografía	BIONOTE. Anigen Rapid CPV Ag Test Kit

a. Descripción

El kit de test rápido Anigen para CPV Ag es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa de antígeno de Parvovirus canino en heces caninas. El kit de test rápido Anigen para CPV Ag es presenta la palabra “T” y “C” como línea del test y línea de control, en la superficie del dispositivo. Ambas, la línea de prueba y la línea de control no son visibles en la ventana de resultados antes de aplicar las muestras. La línea de control es utilizada para procedimientos de control. En la ventana de resultados aparecerá una línea de color purpura si existe suficiente antígeno Parvovirus en la muestra La línea de control debe aparecer siempre si el procedimiento es realizado apropiadamente y los reactivos de la prueba la prueba es realizada correctamente y los reactivos del control de la prueba están funcionando bien. En la ventana de resultados aparecerá una línea del test de color purpura si existe suficiente antígeno de Parvovirus en la muestra. En la banda del test, se utilizan anticuerpos de Parvovirus Canino especialmente seleccionados como materiales de captura y como material de detección. Ello

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

permite al kit de test rápido Anigen Rapid CPV Ag identificar antígenos de Parvovirus canina en heces caninas con un alto grado de exactitud.

b. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

El kit puede almacenarse a temperatura ambiente (2-30° C) o refrigerado. El kit es estable hasta la fecha de vencimiento que aparece marcada en la etiqueta del empaque. NO CONGELE EL KIT. No se debe almacenar bajo la luz solar directa.

c. Preparación De Las Muestras

PASO 1. Para este test, deben usarse muestra de heces canina s.

PASO 2. Las muestras deben ser evaluadas inmediatamente como sean tomadas.

d. Procedimiento

PASO 1. Recolecte las muestras de heces caninas usando un hisopo.

PASO 2. Inserte el hisopo en el tubo para muestras que contiene 1 mL de diluyente de la prueba.

PASO 3. Mezcle la muestra del hisopo con el diluyente de la prueba en el pozo de extracción.

PASO 4. Remueva el dispositivo de prueba de las bolsas de papel aluminio y colóquelo en una superficie plana y seca.

PASO 5. Usando el gotero desechable provisto, recoja las muestras del tubo de muestra donde se extrajeron y se mezclaron.

PASO 6. Agregue cuatro (4) gotas en el orificio de la muestra usando el gotero desechable. El diluyente mezclado de la prueba debe agregarse con exactitud, de manera suave, gota a gota.

PASO 7. Al inicio de la prueba, se apreciará un color purpura que se desplaza por la ventana de resultados en el centro del dispositivo de la prueba. Si la migración no aparece después de 1 minuto, agregue una gota más del diluyente mezclado de la prueba en el pozo de muestra.

PASO 8. Para mejores resultados. Realice el test en 5 muestras de heces diarreicas en el criadero.

PASO 9. Interprete los resultados del test en 5 ~ 10 minutos. No los interprete después de 20 minutos.

e. Lectura E Interpretación De Resultados

En la sección izquierda de la ventana de resultados aparecerá una banda de color para indicar que el test está funcionando correctamente; es la banda de control. La sección derecha de la ventana de resultados indica los resultados del test. Si aparece una banda de color diferente en la sección derecha de la ventana de resultados, es la banda del test.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Resultado negativo: La presencia de una sola banda en la ventana de resultados indica un resultado negativo

Resultado positivo: La presencia de dos bandas a color (“T” y “C”) en la ventana de resultados, sin importar cuál aparezca primero, indica un resultado positivo.

Resultado inválido: Si la banda púrpura no aparece en la ventana de resultados después de haber realizado el test, el resultado se considera inválido. Es posible que no se hayan seguido correctamente las instrucciones o el test pudo haberse deteriorado. Se recomienda volver a realizar el test para esa muestra.

f. Limitaciones Del Test

Aunque el Kit del Test Rápido para la detección del Antígeno del virus de Parvovirus Canino es muy seguro, puede ocurrir una baja incidencia de resultados falsos. Si se obtienen resultados cuestionables, se deben realizar otras pruebas clínicamente disponibles. Como sucede con todas los tests diagnósticos, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de un solo test, sino que debe formularlo un veterinario después de haber evaluado todos los hallazgos clínicos y de laboratorio. El límite de detección de este test es aproximadamente 104.0TCID50/0.1ml.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

8. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha de Revisión	Versión	Descripción del cambio	Responsable

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

1. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos son proteínas producidos por la respuesta inmune para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias y virus. El anticuerpo típico está constituido por dos unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño y son sintetizados por un tipo de leucocito denominado linfocito B. Los anticuerpos pueden presentarse en distintas variedades conocidas como isotipos o clases. Existen cinco isotipos de anticuerpos conocidos como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Se nombran mediante el prefijo "Ig" que significa inmunoglobulina y difieren en sus propiedades biológicas, localizaciones funcionales y capacidad para reconocer diferentes tipos de antígenos.

Entonces la realización de pruebas inmunológicas puede ser utilizadas para varios propósitos: diagnóstico, prevención, vigilancia activa, elección de momentos de vacunación, seguimiento de programas de vacunación, determinación de estatus sanitarios, calcular indicadores de protección, entre otros; es por esto que el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab tiene implementadas pruebas de diagnóstico por diferentes métodos inmunológicos de ensayo que contribuyen a facilitar el diagnóstico de enfermedades de importancia en sanidad y producción animal.

2. PROPÓSITO

Unificar las instrucciones de realización de métodos de ensayo de inmunología en porcinos realizados en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.

3. ALCANCE

Este documento se tomará como referencia única para la realización de pruebas diagnósticas de Porcinos en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab. De acuerdo con los numerales 7.2.1 Selección y Verificación de Métodos y 7.7 Aseguramiento de la Validez de los Resultados Norma ISO/IEC 17025:2017.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, L. y col. Universidad de León – Universidad Santiago de Compostela Universidad de Zaragoza Patología médica veterinaria. Sangre y sistema inmunitario, 2003

- Gómez, Esperanza y Col. Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunológicas. Recursos Educativos Serie Veterinaria 3(15):94-121, 2011 ISSN: 1989-5003

- INgezim Circovirus IgG/IgM 11.PCV.K2. Última revisión / Last revisión: 04-02-08 N° Registro en España Mapa N°805RD

- INgezim M.HYO COMPAC R.11.MHYO. K3 Última revisión / Last revisión: 05-02-08 N° Registro en España 3047RD

- INgezim PRRS UNIVERSAL R.11.PRU.K1 Última revisión / Last revisión: 06-06-14 N° Registrado por el MAPA N° 1053 RD

- INTA Curso de Técnicas de Diagnóstico en Virología Animal Instituto de Virología - C.I.C.V. –INTA

- OIE. MANUAL DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y DE LAS VACUNA PARA LOS ANIMALES TERRESTRES 2013. Organización mundial de sanidad animal (OIE)

- Universidad Autónoma del Estado de México. Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología. Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Actualización 2013. Recuperado en http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_974_MP%20Virolog%C3%ADa.pdf

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

5. DEFINICIONES

- **ANTICUERPOS:** Proteínas producidas por el sistema inmunológico para identificar y neutralizar las sustancias dañinas y/o extrañas a un individuo (antígenos). Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B.

- **ANTICUERPOS MONOCLONALES**: anticuerpo homogéneo producido por un clon de células. Este clon está derivado de una célula híbrida, creada a partir de la fusión de una sola célula madre del sistema inmune y una célula plasmática tumoral. Este clon de linfocitos B fabrica anticuerpos idénticos y específicos para un antígeno. Con esto se consigue producir anticuerpos monoclonales, muy útiles y utilizados en biomedicina y en biología molecular. En medicina se utilizan, por ejemplo, para detectar la presencia y cantidad de una sustancia en la sangre.

- **ANTÍGENO:** Sustancia extraña y/o dañina que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.

- **INMUNIDAD CELULAR**: Proceso de respuesta inmunológica en la que intervienen las células inmunológicamente competentes: fagocitos, células T y macrófagos. El sistema actúa fagocitando la célula infectada y destruyendo el parásito y la célula hospedadora.

- **INMUNIDAD HUMORAL**: Principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, en el cual, los componentes del sistema inmunitario que atacan a los antígenos, no son las células directamente sino son macromoléculas, como anticuerpos o proteínas del sistema del complemento

- **INMUNOLOGÍA:** Estudio de las respuestas inmunes y sus consecuencias.

- **RESPUESTA INMUNE:** Conjunto de mecanismos fisiológicos que permiten al animal reconocer sustancias extrañas a su organismo, neutralizarlas y eliminarlas o metabolizarlas, con o sin lesión de los tejidos

- **SEROCONVERSIÓN:** Demostración de la presencia de anticuerpos específicos para un antígeno concreto en el suero de un individuo, previamente negativo para dicha especificidad antigénica.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

6. ELISA

El método ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es un inmunoensayo en el que a una fase sólida se ancla un antígeno o anticuerpo conocido, el cual es capaz de fijar un anticuerpo (si está anclado un antígeno) o un antígeno (si está anclado un anticuerpo) desde una muestra problema, a la reacción antígeno- anticuerpo se agrega un conjugado (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima que posteriormente genera un producto detectable colorimétricamente desde un substrato. Se usa para detección de anticuerpos y de antígenos (infecciosos, moleculares, hormonas, etc.), esto permite establecer ausencia o presencia de una infección o de una sustancia. Es un método de ensayo versátil, robusta y relativamente simple con aplicación en el diagnóstico clínico, la detección viral, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc. Existen diferentes tipos de ELISA:

- **ELISA DIRECTA**: Para detección de antígeno. En la fase sólida se encuentran anticuerpos que pueden detectar el antígeno buscado. El conjugado puede estar constituido por anticuerpos marcados o por antígenos marcados (similares a los buscados), en este último caso se genera competencia entre los antígenos de la muestra y los antígenos marcados por el anticuerpo. Los pasos básicos son: incubación de la muestra-anticuerpo, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

- **ELISA INDIRECTA:** Para detección de anticuerpos. En la fase sólida se encuentran antígenos que pueden detectar el anticuerpo buscado. El conjugado está constituido por anticuerpo marcado anti IgG especie específica que se une al anticuerpo anclado al antígeno. Por la naturaleza del conjugado esta prueba es mono especie. Los pasos básicos son: incubación de la muestra-antígeno, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

- **ELISA DE BLOQUEO**: Para detección de anticuerpos. En la fase sólida se encuentran antígenos que pueden detectar el anticuerpo buscado en la muestra. En un primer paso de incubación los anticuerpos presentes en la muestra bloquean el antígeno. Posteriormente se agrega conjugado que está constituido por anticuerpos anti antígeno marcados, que compiten por el antígeno con los anticuerpos presentes en la muestra. Por la naturaleza del conjugado esta prueba es multiespecie. Los pasos básicos son: incubación de la muestra-antígeno, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

- **ELISA COMPETITIVA**: Para detección de anticuerpos. El funcionamiento de esta prueba es similar a la ELISA DE BLOQUEO, la diferencia es que posterior al primer paso de incubación de muestra-antígeno no se realiza lavado, sino que se agrega conjugado para que compita por el antígeno con la muestra. Es una prueba multiespecie.

- **ELISA DE DOBLE RECONOCIMIENTO**: Para detección de anticuerpos. En la fase sólida se encuentran antígenos que pueden detectar el anticuerpo buscado. El conjugado está constituido por antígeno marcado que puede unirse al anticuerpo ya anclado al primer antígeno. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Por la naturaleza del conjugado esta prueba es multiespecie. Los pasos básicos son:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

incubación de la muestra-antígeno, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

Para la realización de este método de ensayo es necesario seguir las siguientes instrucciones:

- Leer y seguir cuidadosamente las instrucciones de cada método analítico suministradas por el fabricante.
- Usar los kits solamente para diagnóstico in vitro
- Almacenar los kits de reactivos entre 2 y 8°C
- Estabilizar todos los reactivos al menos una hora a temperatura 18-25°C antes de cada uso.
- Se debe verificar ausencia de cristales de precipitación en las soluciones diluyentes y soluciones de lavado. Si se observan cristales, se pueden disolver calentando los recipientes que contienen dichas soluciones a 37°C.
- El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al bote.
- El substrato y la solución de parada deben manipularse con precaución. Se debe evitar contacto con piel, ojos y mucosas. En caso de accidente, enjuagar con abundante agua de grifo.
- No mezclar componentes de diferentes lotes de kits.
- Se debe evitar la contaminación de los reactivos.
- El material de vidrio utilizado durante la ejecución de los ensayos debe estar limpio, sin resto de detergentes.
- No utilice agua que pueda contener oxidantes (por ejemplo, hipoclorito de sodio) o sales de metales pesados, ya que estas sustancias pueden reaccionar con el cromógeno.
- Desechar todas las soluciones contaminadas con bacterias y/o hongos.
- Todos los materiales y equipos desechables que entran en contacto con las muestras deben ser considerados potencialmente infecciosos y eliminados de acuerdo con la legislación vigente en el país.
- Para garantizar la fiabilidad de los resultados, se deben seguir los protocolos.
- Se debe tener especial cuidado en observar los tiempos y temperaturas de incubación, así como medir los volúmenes y las diluciones con precisión.
- Recuerde que algunos componentes de los kits de reactivos son de origen animal, es decir representan riesgo biológico, igualmente otros componentes son sustancias de riesgo químico, así que deben contemplarse las medidas de bioseguridad.
- **NO OLVIDE MARCAR TODOS LOS ELEMENTOS QUE UTILICE DURANTE LA PRUEBA:** Esto incluye recipientes para dispensación /preparación de reactivos, muestras, placas de predilución y placas recubiertas de antígeno.
- Diligenciar hoja de trabajo para los controles y muestras que se incluirán en el ensayo en el LBFMT060 Hoja de Trabajo ELISAS.
- Transcribir los resultados en el LBFMT048 Informe de Resultados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS: Cada casa comercial establece los criterios de interpretación de los resultados, los cuales serán informados de acuerdo a dichos criterios.

6.1. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DEL MÉTODO:** Los resultados son válidos cuando cumplen los criterios de validación de cada casa comercial.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Se deben realizar cartas de control para cada prueba realizada, tipo de control y analista, en el LBFMT013 Cartas Control.
- No se deben mezclar reactivos de diferentes lotes para el montaje de pruebas.
- Se realizará verificación del método de acuerdo al LBPOE009 Aseguramiento de la Validez de los resultados.
- Cada vez que ingrese un nuevo analista y de acuerdo a la DEFMT014 Plan de Trabajo Sistema de Gestión, se debe realizar la supervisión de métodos y diligenciando el LBFMT095 Supervisión Métodos Analíticos e informar a la Gerencia de Calidad que realizará la autorización siguiendo lo definido en el THPOE001 Relación Contractual.
- En esta prueba es de gran importancia el control de la temperatura y del pH del agua destilada/ desionizada, por esta razón se deben controlar estas dos variables de acuerdo a los procedimientos establecidos por el laboratorio para este fin.
- Diligenciar en cada montaje el LBFMT060 Hoja de Trabajo ELISA.
- Si se evidencian servicios no conformes durante la ejecución del ensayo, se debe registrar en el campo “Observaciones” de las hojas de trabajo la fecha de registro en el LBFMT026 Registro y Tratamiento de SNC.

6.2. RECURSOS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS

6.2.1. Equipos

- Lector de ELISA para microplacas de 96 pozos con filtros de longitud de onda 405nm, 450nm y 630nm
- Incubadora - agitador de ELISA (Temperatura de uso 37 +/-1°C)
- Agitador de tubos (Vórtex)
- Lavador de Microplacas ELISA (Opcional)
- Refrigerador 2-8°C
- Cabina de Seguridad Biológica Tipo IIA
- Centrifuga con protección para aerosoles
- Micro pipeta multicanal de volumen ajustable en el rango 5 a 50ul
- Micro pipeta multicanal de volumen ajustable en el rango hasta 200 ul o máximo hasta 350ul
- Micro pipeta mono canal de volumen ajustable en el rango hasta 100 ul
- Micro pipeta mono canal de volumen ajustable en el rango 100 a 1000 ul
- Termómetros para medición de temperatura ambiente y para medios isotermos.
- Cronómetro con alarma audible
- Pipeteador

6.2.2. Insumos

- Puntas nuevas para pipetas de 5-200ul
- Reservorios (Canaletas) para reactivos
- Placas inertes de ELISA fondo plano
- Probeta de 100 ml
- Probeta de 500ml
- Probeta de 1000ml
- Pipeta de 1ml
- Pipeta de 5ml

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Pipeta de 10ml
- Agua destilada o desionizada
- Puntas para pipetas de 100-1000ul

6.2.3. Reactivos

- Kit de reactivo de cada ensayo: con certificados de análisis.

6.2.4. Material De Referencia:

Sueros de Referencia Nacional o secundarios Positivos y Negativos. Si no hay disponibilidad de Sueros de Referencia Secundarios, utilizar sueros de referencia de trabajo preparados en el laboratorio; la caracterización de estos sueros se encuentra en el formato LB FMT 112 Ficha Técnica Material de Referencia.

El procesamiento del material de referencia se lleva a cabo en el caso que exista: un cambio de analista, cada vez que se comience un kit con lote nuevo y en el caso de que la prueba se deje de realizar en un periodo de meses, se realiza un control de resultados en el formato LB FMT 013 Cartas Control.

6.2.5. Elementos De Protección Personal:

- Uniforme.
- Guantes de látex/ Nitrilo
- Gorro.
- Tapabocas.
- Zapato antideslizante
- Careta

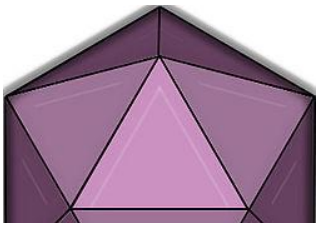
7. CIRCOVIRUS

7.1 DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Es causada por el Circo virus porcino tipo2 (PCV2). Clínicamente se presenta como una enfermedad de síndrome del desmedro multisistémico post-destete en cerdos de transición y engorde. El virus es muy pequeño y muy resistente en el ambiente. Existen dos serotipos: el Tipo 1 que no causa ninguna enfermedad conocida, y el Tipo 2 que causa enfermedades en cerdos. El Circo virus porcino tipo 2 ha sido asociado a abortos tardíos, nacidos muertos, fetos momificados y aumento de la mortalidad en maternidad. En algunos casos puede observarse hipertrofia cardíaca en el feto, pero la lesión más significativa en estos animales es una miocarditis de tipo no supurativa a necrotizante, asociada con abundante antígeno de PCV2.

Una manifestación especial del PCV2 consiste en síndrome de dermatitis y nefropatía porcina. Este síndrome aparece principalmente en cerdos de crecimiento y engorde y raramente afecta a otros grupos de edad. Como su nombre indica se presenta clínicamente en forma de lesiones de piel y afecta los riñones. Es posible que los

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/43/Icosaedro_circovirus.jpg/250px-Icosaedro_circovirus.jpg



TIPO 2

signos clínicos aparezcan esporádicamente en un número reducido de animales. La mortalidad en cerdos afectados es casi un 100%.

Es un virus ADN de cadena sencilla (clase II), es decir, sin cubierta, con un genoma circular no segmentado. La cápside viral tiene simetría icosaédrica y mide aproximadamente 17nm de diámetro. PCV es un miembro de la familia *Circoviridae,* que infectan animales.

7.1.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI CIRCOVIRUS PORCINO

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo porcino	Determinación de anticuerpos anti Circovirus porcino tipo 2 en muestras biológicas de suero porcino por el método ELISA de captura	INgezim Circovirus IgG/IgM 11.PCV.K2 Última revisión / Last revision: 04-02-08 N° Registro en España Mapa N°805RD

a. <u>Descripción</u>

Ensayo inmunoenzimático de captura para la detección de anticuerpos tipo IgM e IgG específicos de Circovirus porcino tipo 2 en suero de cerdo.

Dos anticuerpos monoclonales (AcMS), uno específico de IgG de cerdo y otro específico de IgM son fijados a placas diferentes. Cuando las muestras se añaden a las placas, los anticuerpos IgM e IgG presentes en el suero serán capturados por el AcM de cada placa. Tras lavar para eliminar el material no unido, se añade el antígeno (Cápsides vacías recombinantes de Circovirus) que quedará unido al pocillo solo si el suero contenía IgM y/o IgG específicas del Circovirus tipo 2.

Tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, podrá demostrarse la presencia de este antígeno mediante la adición de un AcM específico del Circovirus conjugado con peroxidasa. Luego se añade el sustrato adecuado, los pocillos en los que se ha ensayado sueros con anticuerpos IgM y/o IgG específicos presentarán una reacción coloreada, mientras que en los pocillos en los que se hayan ensayado sueros negativos, no aparecerá ninguna reacción coloreada.

b. <u>Precauciones</u>

1. Leer atentamente las instrucciones de uso
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
6. No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit
10. **IMPORTANTE:** El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las condiciones externas, por lo que se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.
11. La solución de frenado es una solución fuerte, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.

c. Composición Del Kit

REACTIVO	4 PLACAS	
	Unid	Vol.
Placas de micro titulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras anti IgG	2	-
Placas de micro titulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras anti IgM	2	-
Viales con suero Control Positivo IgG listo para su uso	1	4ml
Viales con suero Control Positivo IgM listo para su uso	1	4ml
Viales con suero Control Negativo listo para su uso	1	4ml
Viales de antígeno recombinante listo para su uso	1	50ml
Viales de conjugado Peroxidasa 100x	1	700ul
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1	125ml
Frascos de diluyente (DE10-01)	2	125ml
Frascos con sustrato (TMB)	1	65ml
Frascos con solución de frenado	1	65ml

I. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-200ul
- Puntas de Micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas
- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 450nm)

II. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y +8ºC).

d. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una Micro pipeta que permita dispensar la cantidad de 300µl por pocillo. Tras las incubaciones realizar los lavados según las siguientes instrucciones.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Eliminar el contenido de la placa volteándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre pocillos. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución desinfectante, ya que, si bien el antígeno utilizado en el kit es absolutamente inerte, los sueros problema pueden tener agentes infecciosos.
- Distribuir unos 300µL de
- solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado. Tras el lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel absorbente.

e. <u>Preparación De Muestras</u>

Realizar la dilución 1/100 en el diluyente DE10-01 (5µL de suero en 0,5 ml de diluyente).

Realizar doble dilución de la siguiente manera: La primera dilución será de 1/20 donde la cantidad final es de 200 ul (10 ul de muestra y 190 de diluyente) de esta adicionar 20 ul + 80 ul (1/5) de diluyente en la placa tapizada con anticuerpos, dando como resultado una dilución 1/100.

f. <u>Preparación De Los Reactivos</u>

- **Solución de lavado 25x:** Diluir una parte de la solución concentrada en 24 partes de agua destilada (100ml de solución concentrado más 2.4L de agua destilada) una vez preparada la solución, permanece estable mantenida entre +2ºC y+ 8ºC
- **Diluyente:** El diluyente viene listo para el uso, no diluir.
- **Sueros controles (+) y (-):** Los sueros controles vienen listos para su uso. No diluir. Hay un control positivo para IgG, otro para IgM y un único control negativo.
- **Antígeno:** Se presenta listo para su uso en una solución coloreada. No diluir.
- **Conjugado:** Realizar una dilución 1:100 en diluyente inmediatamente antes de su utilización (10µL en 990 de diluyente, es necesaria para una tira; 110µL de conjugado en 11mL de diluyente, es la cantidad necesaria por placa. Agitar muy bien la solución antes de su utilización, preparar el volumen necesario a utilizar, ya que la solución sobrante debe ser desechada.
- **Sustrato:** Se suministra a dilución de uso.
- **Solución de Frenado**: Viene lista para su uso.

g. <u>Procedimiento</u>

PASO 1. Sacar del refrigerador los componentes del kit (excepto el conjugado) y equilibrar a temperatura ambiente antes de empezar el ensayo.

PASO 2. Añadir las muestras en las cantidades especificadas anteriormente y 100µL de cada muestra control tanto a pocillos de la placa IgG como IgM (añadir el control negativo a ambas placas y cada control positivo a su placa correspondiente). Se recomienda hacer por duplicado tanto las muestras como los controles. Cubrir e **incubar 1 hora a 37ºC.**

PASO 3. Lavar 4 veces según instrucciones anteriores.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 4. Añadir 100µL del antígeno. Cubrir e **incubar 30 minutos a 37ºC.**

PASO 5. Lavar 4 veces según procedimiento indicado.

PASO 6. Añadir 100µL de conjugado diluido como se ha indicado a cada pocillo. Cubrir e **incubar 30 minutos a 37ºC**

PASO 7. Lavar 4 veces.

PASO 8. Añadir 100µL del sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción durante **5 minutos** a temperatura ambiente.

PASO 9. Añadir 100µL de solución de frenado a cada pocillo. Añadirla en el mismo orden en que se dispensó la solución sustrato.

PASO 10. Leer inmediatamente a 450 nm de longitud de onda en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

h. Lectura E Interpretación De Resultados

Validación del test: Realizar la lectura en un lector de ELISA a **450 nm.** El test se considerará valido cuando:

- **DO controles positivos en sus pocillos IgG e IgM correspondientes sean mayores de 0,7**
- **DO control negativo en pocillos IgG e IgM sea menor de 0,3**

i. Interpretación de resultados:

- **PUNTO DE CORTE IgM:** D.O. 450 nm control positivo IgM x 0,4
- **PUNTO DE CORTE IgG:** D.O. 450 nm control positivo IgG x 0,3

Si se ensayan las muestras y controles por duplicado, el valor de DO será la media aritmética de ambos pocillos.

- **MUESTRAS CON VALORES DE ABSORBANCIA MENORES QUE LOS PUNTOS DE CORTE**

Aquellas muestras cuyos valores de DO, tanto para IgG como para IgM, sean menores que los puntos de corte se considerarán como muestras con títulos para Circovirus menores o iguales a 1/100. Estos corresponderían con animales negativos o que hayan tenido un contacto con el virus hace mucho tiempo.

- **MUESTRAS CON VALORES DE ABSORBANCIA MAYORES QUE LOS PUNTOS DE CORTE**

En este caso se pueden distinguir entre tres tipos de muestras:

- IgM > IgG: infección activa
- IgG> IgM y título de IgM > 1/100: Infección recientemente (Entre uno y dos meses)

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- IgG > IgM y título de IgM < 1/100: Contacto viral menos reciente que el caso anterior.

8. MYCOPLASMA HYOPNEMUMONIAE

Mycoplasma hyopneumoniae es un importante microorganismo patógeno del ganado porcino en todo el mundo. Las cepas pueden diferir en sus características virulentas inherentes y en la expresión clínica de la enfermedad que provocan, que también está influida por factores del hospedador, como la inmunidad adquirida, el estrés y las enfermedades concomitantes, y por factores de manejo, como la densidad de población, la calidad del aire y las prácticas de bioseguridad. La infección por *M. hyopneumoniae* provoca una pérdida de la motilidad de los cilios y de la integridad de las vías bronquiales, lo que reduce las defensas naturales de las vías respiratorias superiores y las hace más vulnerables a infecciones secundarias. Este microorganismo es un componente etiológico fundamental de dos síndromes patológicos de gran importancia que afectan a la industria porcina: la neumonía enzoótica y el complejo respiratorio porcino (CRP).

La **neumonía enzoótica** es una enfermedad crónica muy extendida caracterizada por tos, retraso del crecimiento y reducción del índice de conversión. La infección por *M. hyopneumoniae* debilita las defensas naturales de las vías respiratorias y permite infecciones secundarias por bacterias como *Pasteurella multocida, Haemophilus parasuis, Actinobacillus pleuropneumoniae, Streptococcus suis y Bordetella bronchiseptica,* lo que precipita los cuadros clínicos y subclínicos.

El **complejo respiratorio porcino (CRP)** es una manifestación más grave de esta enfermedad, que en los últimos años ha sido cada vez más frecuente tras una infección concurrente con el Circovirus porcino del tipo 2 (CVP2), el virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (SRRPV) y/o el virus de la gripe porcina (VGP). La gravedad clínica es mayor que la observada en la neumonía enzoótica, y puede provocar una mortalidad significativa. El impacto de la infección por *M. hyopneumoniae* puede ser grave, tanto en términos económicos como de bienestar animal. Una vez establecida, la infección por *M. hyopneumoniae* puede permanecer durante períodos prolongados en las explotaciones afectadas, a pesar de los programas de vacunación.

8.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo porcino	Determinación de anticuerpos anti *Mycoplasma hyopneumoniae en* muestras biológicas de suero porcino por el método ELISA de bloqueo	INgezim M.HYO COMPAC R.11.MHYO. K3 Última revisión / Last revisión: 05-02-08 N° Registro en España 3047RD

a. <u>Descripción</u>

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* en suero porcino.
Se basa en una placa de poliestireno donde está fijado el antígeno *M. hyo*., se añaden las muestras de suero y en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un conjugado específico marcado con peroxidasa. (Anticuerpo monoclonal específico para *M. hyo*). En el caso de que las muestras contuvieran anticuerpos contra el antígeno, estos no permitirían la unión del conjugado, mientras que, si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el conjugado se unirá libremente al antígeno de la placa. Esta unión se detecta tras la adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de peroxidasa.

b. Precauciones

1. Leer atentamente las instrucciones de uso
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
6. No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit
10. **IMPORTANTE:** El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las condiciones externas, por lo que se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.
11. La solución de frenado es una solución fuerte, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua

c. Composición Del Kit

REACTIVO	5 PLACAS	
	Unid	Vol.
Placas recubiertas con antígeno de 96 pocillos divididas en 12 tiras	5	-
Viales con suero Control Positivo para *M. hyo* listo para su uso	2	2ml
Viales conteniendo suero Control Negativo para *M. hyo* listo para su uso	2	2ml
Viales de conjugado (AcM anti *M.hyo* – HRPO) listo para su uso	2	30ml
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1	125ml
Frascos de diluyente (DE01-01) a la dilución de uso	1	125ml
Frascos con sustrato (TMB)	1	30ml
Frascos con solución de frenado	1	60ml

III. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-200ul
- Puntas de micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 450nm)

IV. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y +8ºC), manteniéndose estables hasta la fecha de caducidad indicada.

d. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una micro pipeta que permita dispensar la cantidad de 300µL por pocillo. Tras las incubaciones realizar los lavados según las siguientes instrucciones.

- Eliminar el contenido de la placa volteándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre pocillos.
- Distribuir unos 300µL de solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado.
- Tras el lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel absorbente.

e. Preparación De Los Reactivos

- **Solución de lavado 25x:** Diluir una parte de la solución concentrada en 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrado más 960 ml de agua destilada)
- **Sueros controles (+) y (-):** Se suministran listos para su uso, añadir 100µl por pocillo.
- **Conjugado:** No necesita preparación previa. Viene listo para uso (NO DILUIR)
- **Sustrato:** Se suministra a dilución de uso.

f. Preparación De Muestras

Realizar la dilución 1/2 en el diluyente. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 50µl de diluyente y luego 50µl de la muestra. Agitar suavemente para una correcta homogeneización de la mezcla.

g. Procedimiento

PASO 1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.

PASO 2. Dispensar 100µL de suero control positivo a un pocillo y 100µL de suero control negativo en otro pocillo.

PASO 3. Añadir 50 µl de diluyente al resto de los pocillos que se vayan a usar. Añadir 50µl de los sueros problema a ensayar.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 4. Tapar la placa e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25ºC)

PASO 5. Lavar 4 veces la placa según procedimiento descrito.

PASO 6. Añadir 100µL de conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo. Tapar la placa e Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (18-25ºC).

PASO 7. Lavar 6 veces la placa según procedimiento descrito.

PASO 8. Añadir 100µL de sustrato en cada pocillo. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).

PASO 9. Añadir 100µL de solución de frenado a cada pocillo. ¡ATENCIÓN! La solución de frenado ha de dispensarse en el mismo orden en que se añadió la solución sustrato.

PASO 10. Leer los valores de absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA en los siguientes 5 minutos a la adición de la solución de frenado.

h. Lectura E Interpretación De Resultados

En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la media aritmética de los dos valores de DO obtenidos. Igualmente se realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para control positivo y los dos pocillos para el control negativo.

Validación del test
DO Control Positivo/ DO Control Negativo <0.25
DO Control Negativo >0,75

Cálculo de punto de corte
Punto de Corte (-) = 0,45 x Control Negativo
Punto de Corte (+) = 0,40 x Control Negativo

Cálculo de % de Bloqueo

$$\% \text{ BLOQUEO} = 100 - \frac{\text{DO muestra} \times 100}{\text{DO C. Negativo}}$$

i. Interpretación de resultados:

Las muestras se considerarán POSITIVAS (presentan anticuerpos frente a M. hyo), cuando su DO 450 nm sea igual o inferior al cuttoff positivo (40% del control negativo).

Las muestras se considerarán NEGATIVAS (ausencia anticuerpos frente a M. hyo), cuando su DO 450 nm sea igual o inferior al cuttoff negativo (45% del control negativo).

Las muestras que presenten porcentajes de unión entre ambos valores se considerarán DUDOSAS y en estos casos se recomienda testar de nuevo el animal transcurridas 2 semanas.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

9. SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (PRRS)

El PRRSV es un pequeño virus de ARN con envoltura. Contiene un genoma de ARN mono catenario de sentido positivo con un tamaño de aproximadamente 15 kilo bases. PRRSV es un miembro del género *Arterivirus*, familia *Arteviridae*, orden *Nidovirales*.

También conocida como **enfermedad del cerdo de oreja azul**. Esta enfermedad es económicamente importante porque causa una falla reproductiva en el ganado reproductor y en las enfermedades del tracto respiratorio en cerdos jóvenes. Inicialmente conocida como "misteriosa enfermedad porcina" y "síndrome reproductivo misterioso", se informó por primera vez en 1987 en América del Norte y Europa Central. Las infecciones subclínicas son comunes, con signos clínicos que ocurren esporádicamente en un rebaño. Los signos clínicos incluyen falla reproductiva en cerdas como el aborto y el nacimiento de fetos muertos o momificados, y cianosis del oído y la vulva. En cerdos recién nacidos, la enfermedad causa dificultad respiratoria, con una mayor susceptibilidad a infecciones respiratorias como la enfermedad de Glasser.

El virus es muy susceptible al ambiente y a los desinfectantes y se caracteriza por su gran capacidad para mutar. El virus tiene una particular afinidad por los macrófagos alveolares, que se encuentran en el pulmón. Los macrófagos son parte del sistema inmunológico ya que ingieren y eliminan las bacterias y los virus invasores. El virus se multiplica dentro de los macrófagos produciendo más virus y las células mueren en el proceso. Destruye hasta un 40% de los macrófagos lo cual acaba con la mayor parte de los mecanismos de defensa del animal y permite que bacterias y otros virus proliferen y causen daño en el sistema respiratorio. El virus puede cruzar la placenta e infectar a los fetos desde los 70 días de gestación, causando abortos en el tercer trimestre y lechones muertos o momificados.

La situación clínica puede variar mucho de una granja a otra ya que hay una enorme cantidad de cepas diferentes. Pese a la secuenciación del virus, es imposible predecir la virulencia, presentación clínica, o protección cruzada entra cada cepa identificada. El virus se puede transmitir por medio del semen. Muchas granjas modernas, se basan en su sistema de bioseguridad para la prevención del PRRS. Investigaciones recientes han identificado genéticas más resistentes al virus. La presentación crónica es muy variable. Usualmente la forma clínica es similar a la aguda pero sólo afecta a un porcentaje de los animales, especialmente cerdas primerizas. La forma crónica afecta continuamente a los animales de todas las edades, pero con una clínica menos severa.

9.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI VIRUS DE SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTOR PORCINO (PRRS)

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo porcino	Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos frente al Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino (cepas americanas y europeas) en suero de cerdo.	INgezim PRRS 2.0 Prod Ref.: 11.PR.K1 Última revisión / Last revisión: 17-01-2018 N° Registrado por el MAPA N° 3200 RD

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

a. Fundamento Técnico del kit

La detección de anticuerpos contra PRRS se basa en un ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto el cual se lleva a cabo sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se dónde está fijado el antígeno recombinante, más concretamente el ORF-7 procedente de aislados europeos y americanos, capaz de unirse a anticuerpos específicos tanto de cepas europeas como americanas del virus PRRS. Cuando sobre la placa se dispensa el suero problema, en el caso de que existan anticuerpos específicos frente a este antígeno, éstos quedarán fijados a la misma. Tras realizar una serie de lavados con los que se eliminará el resto de los componentes del suero no adheridos, podremos revelar la presencia de inmunoglobulinas mediante un conjugado específico marcado con peroxidasa. Tras añadir el sustrato, se producirá una reacción colorimétrica que podrá ser leída mediante un espectrofotómetro a 450nm.

b. Precauciones

1. Leer atentamente las instrucciones de uso
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
6. No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit
10. **IMPORTANTE:** El sustrato es extremadamente sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.
11. La solución de frenado es un ácido, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.

c. Composición Del Kit

REACTIVO	5 PLACAS	
	Unid	Vol.
Placas de micro titulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo listo para su uso	2	4ml
Viales conteniendo suero Control Negativo listo para su uso	2	4ml
Viales de conjugado Peroxidasa 100x	2	30ul
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1	125ml
Frascos de diluyente de suero (DE13-01) a la dilución de uso	2	60ml
Frascos de diluyente para conjugado (DE01-01)	1	125 ml
Frascos DE sustrato (ABTS)	1	60ml
Frascos de frenado	1	60ml

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

I. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-200µl
- Puntas de micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas
- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 450nm)

II. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Mantener todos los componentes entre +2ºC y +8ºC.

III. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una micro pipeta que permita dispensar la cantidad de 300 µl por pocillo. Tras las incubaciones, realizar los lavados según las siguientes instrucciones:

- Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de sosa, ya que, si bien el antígeno utilizado en el kit es absolutamente inerte, los sueros problema pueden contener agentes infectivos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado Tras el lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

IV. Preparación De Las Muestras

Realizar la dilución 1/40 en el diluyente DE13-01 suministrado (Por ejemplo 5 µl de suero + 195 µl de diluyente de suero, DE13-01).

V. Preparación De Reactivos

- **Solución de lavado 25x:** Diluir una parte de la solución concentrada en 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrado más 960 ml de agua destilada) una vez preparada la solución, permanece estable mantenida entre +2ºC y+ 8ºC.
- **Sueros Controles (+) y (-):** Los sueros controles se presentan listos para su uso. No diluir.
- **Conjugado:** El conjugado se presenta listo para su uso. No diluir.
- **Diluyente:** se presenta listo para su uso. No diluir.

VI. Procedimiento

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

2. Dispensar 100 µl de suero control positivo a dos pocillos y 100 µl de suero control negativo en otros 2 pocillos. Dispensar 100 µl de cada una de las diluciones de sueros a testar (preparados según instrucciones anteriores) en el resto de los pocillos. Tapar la placa e incubar **30min** a **Temperatura ambiente** (18-25ºC).
3. Lavar 3 veces la placa según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl de conjugado listo para su uso a cada pocillo. Tapar la placa e incubar **30 minutos** a **temperatura ambiente** (18- 25ºC).
5. Lavar 5 veces la placa según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de solución sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción 15 minutos a temperatura ambiente. Se recomienda la utilización una pipeta multicanal para este proceso a fin de agilizarlo lo más posible.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato.
8. Leer a 450 nm en un lector de ELISA.

VII. Lectura E Interpretación De Resultados

La lectura se realiza a una longitud de onda de 450 nm.

Validación del test:

El kit se considerará válido cuando: El promedio de la Abs 450nm del Control (+) menos el promedio de la Abs 450nm del Control (-) es mayor de 0.25 y además la absorbancia del control negativo es menor de 0.25.

Cálculo del índice de positividad (M/P):

Si las muestras y controles se han ensayado por duplicado, hallar la media aritmética de las dos absorbancias obtenidas.

Para calcular el índice M/P realizar la siguiente operación

$$M/P = \frac{(Abs450\ nm\ Muestra) - (Abs450nm\ C\ -)}{(Abs\ 450nm\ C\ +) - (Abs\ 450nm\ C\ -)}$$

Los valores M/P negativos serán considerado con valor 0.

Puntos de corte:

Se considera una muestra como positiva si su índice M/P es igual o superior a 0.4 Se considera una muestra como negativa si su índice M/P es < 0.40.

10. PARVOVIRUS PORCINO

Esta es la causa más frecuente e importante de infertilidad infecciosa en cerdas primerizas. El parvovirus porcino es un virus bastante resistente que se multiplica normalmente en el intestino del cerdo sin causar signos clínicos. Se encuentra por todo el mundo. Es por lo tanto una infección con la que hay que convivir y aprender a manejar. El parvovirus puede persistir fuera del cerdo durante muchos meses y es resistente a la mayoría de desinfectantes. Esto tal vez explica por qué se encuentra tan extendido y es difícil de eliminar.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

La PVP provoca falla reproductiva caracterizada por infección, muerte y momificación de los embriones o fetos, usualmente sin signos en la cerda. Se desarrolla en hembras negativas expuestas por vía oro nasal durante la primera mitad de la gestación, con subsiguiente infección transplacentaria. Después del virus de PRRS, al Parvovirus porcino se le atribuye la mayor causa infecciosa de muerte embrionaria y fetal. El virus es termoestable, resistente a muchos desinfectantes y enzimas y permanece infectivo por meses en secreciones y excreciones. Aglutina glóbulos rojos de varias especies y esta característica se utiliza con fines diagnósticos. La ruta de infección es oro nasal y en cerdas gestantes transplacentaria. Las cerdas inmunizadas eliminan anticuerpos por calostro que se degradan con el tiempo, pero que pueden ser protectores hasta los 3 a 7 meses de edad. Esta inmunidad pasiva interfiere el proceso natural de infección y el desarrollo de Inmunidad activa, lo que afecta la difusión de la enfermedad. Las lechonas en desarrollo y primerizas contaminadas son el principal reservorio. Los machos pueden eliminar el virus por semen en periodos críticos.

La infección aguda es subclínica, aunque puede presentarse leucopenia transitoria. La única respuesta a infección es falla reproductiva en la cerda gestante infectada en la primera mitad de la gestación. Las secuelas dependen del período en que ocurre la infección, por lo que se pueden presentar: cerdas repetidoras, falladas, con pocos lechones nacidos totales por muerte embrionaria y reabsorción, alta proporción de lechones nacidos momias que reflejan muerte fetal; y también se reportan infertilidad y abortos.

Hembras gestantes infectadas en la 1ª mitad de la gestación el virus causa muerte embrionaria y fetal con reabsorción o momificación. En estados más avanzados de la gestación no se presentan secuelas. Después de la infección ocurre viremia, el virus pasa a placenta y posteriormente a los fetos. La infección transplacentaria requiere 10 a 14 días en llevarse a cabo y puede haber infección intrauterina parcial de los lechones. El virus no afecta tejidos maternos. Los fetos mueren por daño colectivo a tejidos, incluyendo placenta. La falla reproductiva con muerte embrionaria o fetal sin efecto en las cerdas gestantes es sugestiva (siempre hacer diferencial con PRRS). En un hato endémico la falla se presenta en forma marcada en el grupo de lechonas primerizas. Hay prueba serológica de Inhibición de la hemoaglutinación en sueros o aglutinación directa en líquidos fetales.

10.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI PARVOVIRUS PORCINO POR INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN (HI)

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo y/o fluidos torácicos porcino	Determinación de anticuerpos anti Parvovirus porcino en muestras biológicas de suero sanguíneo y/o fluidos torácicos por Inhibición de Hemaglutinación	Universidad Autónoma del Estado de México. Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología. Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Actualización 2013. Recuperado en http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_974_MP%20Virolog%C3%ADa.pdf

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

a. Fundamentos

Algunos virus (Incluido Parvovirus) poseen en su envoltura glicoproteínas hemaglutinantes. Estas tienen la propiedad de unirse a glóbulos rojos de ciertas especies animales, formando en suspensión, un enrejado de glóbulos rojos-virus (Hemaglutinación). Cuando existen anticuerpos en una muestra que reaccionan con el virus, estos bloquean las hemaglutininas, de forma que al enfrentar esta reacción a los glóbulos rojos no se evidencia hemaglutinación, a esto se le denomina Inhibición de la Hemaglutinación (HI). Es un ensayo con alta sensibilidad, especificidad y bajo costo.

10.1.1 Recursos Para La Realización De Los Ensayos

Equipos:

- Lámpara de luz blanca
- Baño serológico (Temperatura de uso 55 +/-1°C)
- Agitador de tubos (Vortex)
- Refrigerador 2-8°C
- Centrifuga con protección para aerosoles
- Micro pipeta multicanal de volumen ajustable en el rango 5 a 50ul
- Micro pipeta multicanal de volumen ajustable en el rango hasta 200 ul o máximo hasta 350ul
- Micro pipeta mono canal de volumen ajustable en el rango hasta 100 ul
- Micro pipeta mono canal de volumen ajustable en el rango 100 a 1000 ul
- Termómetros para medición de temperatura ambiente y para medios isotermos.
- Cronómetro con alarma audible
- Pipeteador

Insumos:

- Puntas nuevas para pipetas de 5-200ul
- Reservorios (Canaletas) para reactivos
- Placas inertes de ELISA fondo U
- Probeta de 100 ml
- Probeta de 500ml
- Probeta de 1000ml
- Pipeta de 1ml
- Pipeta de 5ml
- Pipeta de 10ml
- PBS 1 X
- Jeringa 10 mL
- Pipetas Pasteur
- Puntas para pipetas de 100-1000ul

Reactivos:

- Suspensión de Glóbulos Rojos al 0,75%
- Albumina 0,2%

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Antígeno: Suspensión de Parvovirus Porcino en concentración correspondiente a 8UH.

Material De Referencia:

- Sueros de Referencia Nacional o Secundarios, Positivo y Negativo
- Si no hay disponibilidad de Sueros de Referencia Secundarios, utilizar sueros de referencia de trabajo preparados en el laboratorio.

Elementos De Protección Personal:

- Uniforme.
- Guantes de látex/ Nitrilo
- Gorro.
- Tapabocas.
- Zapato antideslizante
- Careta

10.1.2 Preparación De Los Glóbulos Rojos Al 0,75%

- Utilizar sangre total anticoagulada con EDTA.
- Centrifugar a 3000rpm por 5 minutos. Con una pipeta Pasteur extraer el suero sanguíneo.
- Adicionar 10 partes de PBS 1X o salina fisiológica y mezclar suavemente.
- Centrifugar a 3000rpm por 5 minutos. Con una pipeta Pasteur extraer el sobrenadante.
- Repetir el lavado con PBS 1x o salina fisiológica dos veces más.
- Descartar el sobrenadante y conservar el paquete de glóbulos rojos.
- Preparar una solución de glóbulos rojos al 0.75%en PBS
- La solución puede conservarse a 4-8 °C por máximo 24 horas.

10.1.3 Preparación De Los Sueros Para Remoción De Inhibidores Inespecíficos

- Dispensar 50ul del suero control positivo en el pozo A1.
- Dispensar 50ul del suero control negativo en el pozo B1
- Dispensar 50ul de los sueros problema o los líquidos torácicos.
- Inactivar a 56° C durante 30 minutos en baño serológico.

10.1.4 Titulación Inicial Del Antígeno (Se debe confirmar la titulación cada que se cambie el antígeno)

- Dispensar 50ul de PBS 1x con albumina al 0,2% en todos los pozos de una microplaca fondo U o V, en las filas A, B Y C desde la columna 2 hasta la 12.
- Adicionar 50 ul del antígeno en las celdas A1, B1 Y CA (Control de antígeno)
- Adicionar 50 ul del antígeno a las celdas A2, B2 y C2. A partir de estas hacer diluciones seriadas con una pipeta multicanal hasta la columna 12.
- Adicionar 50ul de glóbulos rojos al 0,75% en todos los pozos de las filas A, B y C.
- En todos los pozos de la fila D adicionar 50ul de PBS 1x con albumina al 0,2% y 50ul de glóbulos rojos de cobayo al 0,75% (Control de glóbulos rojos)
- Incubar 1 hora a 20-24°C.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Determinar la máxima dilución del virus que produce aglutinación.
- Calcular la concentración correspondiente a 8UH (Unidades hemaglutinantes). Se debe dividir entre 8 el denominador de la máxima dilución a la cual el virus produce aglutinación. El resultado de esta división es el denominador de la dilución a la cual se debe realizar la prueba.
- Ejemplo: La máxima dilución se observó en la columna 6 (Dilución 1:32). Para obtener 8UH se divide 32 entre 8, lo cual es igual a 4. Es decir, se debe hacer dilución 1:4 del antígeno en PBS 1x para realizar la prueba.
- Por placa se requieren 5ml del antígeno diluido. Se debe preparar la dilución de trabajo antes de iniciar la prueba.

10.1.5 Realización De La Prueba

- Dispensar 50ul del suero control positivo tratado en el pozo A1.
- Dispensar 50ul del suero control negativo tratado en el pozo B1.
- Dispensar 50 ul de las muestras en los pozos C1, D1, E1, F1, G1 y H1. Las muestras pueden ser evaluadas individualmente o por duplicado.
- Dispensar 50ul de PBS con albumina 0,2% de todos los pozos de la microplaca fondo U o fondo V.
- Realizar diluciones seriadas para todas las filas con pipeta multicanal desde la columna 1 hasta la columna 12.
- Dispensar 50ul del antígeno titulado (8UH) desde la columna 1 hasta la 12.
- Agitar cuidadosamente la microplaca.
- Incubar 1 hora a 20-24°C o 18 horas a 4°C.
- Dispensar en todos los pozos de la microplaca 50ul de glóbulos rojos al 0,75%.
- Incubar 1 hora a 20-24°C.
- Leer la última dilución del suero que no presenta hemaglutinación.

10.2 Interpretación De Resultados

- La última dilución del suero que no presenta hemaglutinación es el título de los anticuerpos específicos contra el virus de la Parvo virosis Porcina.
- Se considera Positivo un título HI mayor o igual a 1:256.
- En cerdas de reemplazo no vacunadas se considera el resultado negativo cuando los títulos son menores a 1:10.
- Se considera en lechones títulos de anticuerpos maternos entre 1:10 y 1:160, e infección cuando los títulos son mayores a 1;160.
- En líquido torácico de fetos con más de 70 días de gestación cualquier título es positivo e indica infección “in útero”.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

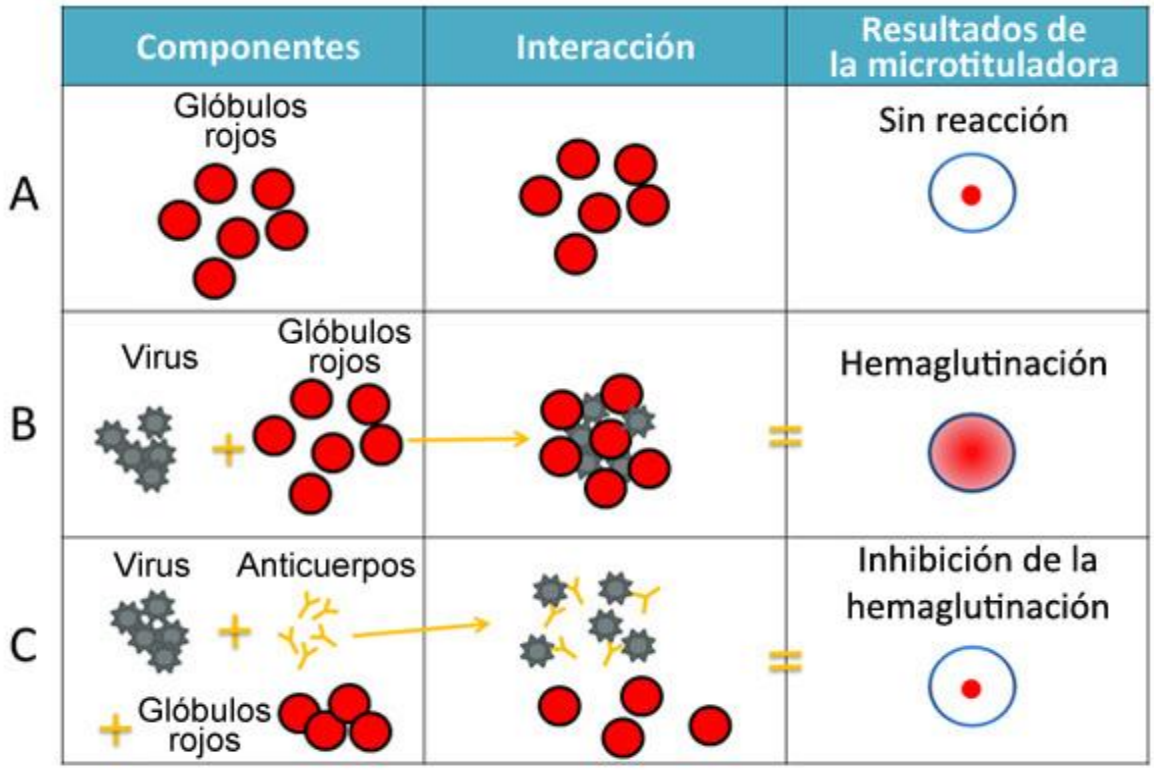


Imagen 1: Interpretación de INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN (HI)

La prueba de IH implica la interacción de glóbulos rojos (RBC), anticuerpos y virus de la influenza. La hilera A muestra que, ante la ausencia del virus, los RBC en una solución se hundirán y se asentarán en el fondo de un pocillo de la placa de micro valoración y tendrán la apariencia de un punto rojo. En la fila B se puede ver que los virus de la influenza se adhieren a los glóbulos rojos cuando se colocan en la misma solución. Esto se conoce como hemaglutinación y está representado por la formación de una estructura de red, que se puede ver en la columna derecha, debajo de "Resultados de micro valoración". En la fila C se puede ver que el anticuerpo se adhiere bien al virus y evita que el virus "pegue" los glóbulos rojos entre sí y formen una estructura de red, y que por consiguiente no se produce hemaglutinación (es decir, se produce la inhibición de la hemaglutinación).

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

10.3 Preparación De Soluciones

SOLUCION BUFFER FOSFATO SALINO 10X (PBS 10X)

NaCl	80g
Kcl	2g
Na2HPO4	11,5g
Agua desionizada	1000ml

Ajustar pH a 7,2 ± 0,2

10.4 Aseguramiento De La Calidad

- **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DEL MÉTODO**: Los resultados son válidos cuando se evidencia botón (no hay hemaglutinación) en la columna 1 (control de muestra) y hemaglutinación en la columna 12 (control de antígeno)
- Cada vez que ingrese un nuevo analista y de acuerdo a la DEFMT014 Plan de Trabajo Sistema de Gestión, la supervisión de métodos se debe realizar y registrar en el LBFMT095 Supervisión Métodos Analíticos e informar a la Gerencia General que realizará la autorización siguiendo lo definido en el THPOE001 Relación Contractual.
- Diligenciar en cada montaje el LBFMT093 Hoja de Trabajo HI.
- Si se evidencian servicios no conformes durante la ejecución del ensayo, se debe registrar en el campo "Observaciones" de las hojas de trabajo la fecha de registro en el LBFMT026 Registro y Tratamiento de SNC.

10. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha de Revisión	Versión Revisada	Descripción del Cambio	Responsable
Junio 10 de 2021	001	Se actualiza el numeral 9.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI VIRUS DE SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTOR PORCINO (PRRS), de acuerdo al nuevo método de referencia utilizado.	Jeanethe Rojas R. Gerente de Calidad.
Julio 26 de 2022	002	Se eliminan algunos insumos en el numeral 6.2.2. Se actualiza el numeral 6.2.4 Material de Referencia. Se actualiza la preparación de las muestras para anti Circovirus (e). Se actualiza la descripción del ensayo para Mycoplasma Hyopneumoniae. Se elimina las columnas	Jeanethe Rojas R. Gerente de Calidad.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

		de 2 placas en 8.1. c y 9.1.c. Se actualiza el Fundamento del Ensayo para PRRS (9.1 a). Se eliminan algunos insumos y reactivos en el numeral 10.1.1. Se modifica la concentración de la dilución de Glóbulos rojos para la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación para Parvovirus. Pasa de 0.6% a 0.75%. Para la misma prueba se ajusta la preparación de los sueros en el numeral 10.1.3. Se elimina la actividad de titulación final del antígeno (10.1.6). Se incluye imagen y explicación de la interpretación de la Inhibición de la Hemaglutinación (HI). Se eliminan algunas soluciones en el numeral 10.3	

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

1. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos son proteínas producidas por la respuesta inmune para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias y virus. El anticuerpo típico está constituido por dos unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño y son sintetizados por un tipo de leucocito denominado linfocito B. Los anticuerpos pueden presentarse en distintas variedades conocidas como isotipos o clases. Existen cinco isotipos de anticuerpos conocidos como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Se nombran mediante el prefijo "Ig" que significa inmunoglobulina y difieren en sus propiedades biológicas, localizaciones funcionales y capacidad para reconocer diferentes tipos de antígenos.

Las pruebas inmunológicas pueden ser utilizadas para varios propósitos: diagnóstico, prevención, vigilancia activa, elección de momentos de vacunación, seguimiento de programas vacunales, determinación de estatus sanitarios, calcular indicadores de protección, entre otros; es por esto que el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab tiene implementadas pruebas de diagnóstico por diferentes métodos inmunológicos de ensayo que contribuyen a facilitar la detección de enfermedades de importancia en sanidad y producción animal.

2. PROPÓSITO

Unificar las instrucciones de realización de los diferentes métodos inmunológicos de ensayo realizados en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.

3. ALCANCE

Este documento se tomará como referencia única para la realización de pruebas diagnósticas de Rumiantes en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.

De acuerdo con los numerales 7.2.1 Selección y Verificación de Métodos y 7.7 Aseguramiento de la Validez de los Resultados Norma ISO/IEC 17025:2017.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, L. y col. Universidad de León – Universidad Santiago de Compostela Universidad de Zaragoza Patología médica veterinaria. Sangre y sistema inmunitario, 2003

- BIO-X Diagnostics. Monoscreen ELISA. Kit ELISA para serodiagnóstico del virus de la parainfluenza 3 bovina (BPI3). Ensayo indirecto para sueros sanguíneos, plasma y leche. Prueba diagnóstica para el ganado. Pozos dobles V 2.2 (23/10/2015)

- Clinton, N.J. Methods in molecular biology. Methods Mol Biol. 2015; 1318:61-7. doi: 10.1007/978-1- 939-2742-5_6.

- Gómez, Esperanza y Col. Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunológicas. Recursos Educativos Serie Veterinaria 3(15):94-121, 2011 ISSN: 1989-5003

- INTA Curso de Técnicas de Diagnóstico en Virología Animal Instituto de Virología - C.I.C.V. –INTA

- OIE. MANUAL DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y DE LAS VACUNA PARA LOS ANIMALES TERRESTRES 2013. Organización mundial de sanidad animal (OIE)

- Universidad Autónoma del Estado de México. Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología. Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Actualización 2013. Recuperado en http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_974_MP%20Virolog%C3%ADa.pdf

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

5. DEFINICIONES

- **ANTICUERPOS:** Proteínas producidas por el sistema inmunológico para identificar y neutralizar las sustancias dañinas y/o extrañas a un individuo (antígenos). Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B.

- **ANTICUERPOS MONOCLONALES**: anticuerpo homogéneo producido por un clon de células. Este clon está derivado de una célula híbrida, creada a partir de la fusión de una sola célula madre del sistema inmune y una célula plasmática tumoral. Este clon de linfocitos B fabrica anticuerpos idénticos y específicos para un antígeno. Con esto se consigue producir anticuerpos monoclonales, muy útiles y utilizados en biomedicina y en biología molecular. En medicina se utilizan, por ejemplo, para detectar la presencia y cantidad de una sustancia en la sangre.

- **ANTÍGENO:** Sustancia extraña y/o dañina que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.

- **INMUNIDAD CELULAR**: Proceso de respuesta inmunológica en la que intervienen las células inmunológicamente competentes: fagocitos, células T y macrófagos. El sistema actúa fagocitando la célula infectada y destruyendo el parásito y la célula hospedadora.

- **INMUNIDAD HUMORAL**: Principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, en el cual, los componentes del sistema inmunitario que atacan a los antígenos, no son las células directamente sino son macromoléculas, como anticuerpos o proteínas del sistema del complemento

- **INMUNOLOGÍA:** Estudio de las respuestas inmunes y sus consecuencias.

- **RESPUESTA INMUNE:** Conjunto de mecanismos fisiológicos que permiten al animal reconocer sustancias extrañas a su organismo, neutralizarlas y eliminarlas o metabolizarlas, con o sin lesión de los tejidos

- **SEROCONVERSIÓN:** Demostración de la presencia de anticuerpos específicos para un antígeno concreto en el suero de un individuo, previamente negativo para dicha especificidad antigénica.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

6. ELISA

El método ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es un inmunoensayo en el que a una fase sólida se ancla un antígeno o anticuerpo conocido, el cual es capaz de fijar un anticuerpo (si está anclado un antígeno) o un antígeno (si está anclado un anticuerpo) desde una muestra problema, a la reacción antígeno- anticuerpo se agrega un conjugado (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima que posteriormente genera un producto detectable colorimétricamente desde un substrato. Se usa para detección de anticuerpos y de antígenos (infecciosos, moleculares, hormonas, etc.), esto permite establecer ausencia o presencia de una infección o de una sustancia. Es un método de ensayo versátil, robusta y relativamente simple con aplicación en el diagnóstico clínico, la detección viral, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc. Existen diferentes tipos de ELISA:

- **ELISA DIRECTA**: Para detección de antígeno. En la fase sólida se encuentran anticuerpos que pueden detectar el antígeno buscado. El conjugado puede estar constituido por anticuerpos marcados o por antígenos marcados (similares a los buscados), en este último caso se genera competencia entre los antígenos de la muestra y los antígenos marcados por el anticuerpo. Los pasos básicos son: incubación de la muestra-anticuerpo, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

- **ELISA INDIRECTA:** Para detección de anticuerpos. En la fase sólida se encuentran antígenos que pueden detectar el anticuerpo buscado. El conjugado está constituido por anticuerpo marcado anti IgG especie específica que se une al anticuerpo anclado al antígeno. Por la naturaleza del conjugado esta prueba es mono especie. Los pasos básicos son: incubación de la muestra-antígeno, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

- **ELISA DE BLOQUEO**: Para detección de anticuerpos. En la fase sólida se encuentran antígenos que pueden detectar el anticuerpo buscado en la muestra. En un primer paso de incubación los anticuerpos presentes en la muestra bloquean el antígeno. Posteriormente se agrega conjugado que está constituido por anticuerpos anti antígeno marcados, que compiten por el antígeno con los anticuerpos presentes en la muestra. Por la naturaleza del conjugado esta prueba es multiespecie. Los pasos básicos son: incubación de la muestra-antígeno, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

- **ELISA COMPETITIVA**: Para detección de anticuerpos. El funcionamiento de esta prueba es similar a la ELISA DE BLOQUEO, la diferencia es que posterior al primer paso de incubación de muestra-antígeno no se realiza lavado, sino que se agrega conjugado para que compita por el antígeno con la muestra. Es una prueba multiespecie.

- **ELISA DE DOBLE RECONOCIMIENTO**: Para detección de anticuerpos. En la fase sólida se encuentran antígenos que pueden detectar el anticuerpo buscado. El conjugado está constituido por antígeno marcado que puede unirse al anticuerpo ya anclado al primer antígeno. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Por la naturaleza del conjugado esta prueba es multiespecie. Los pasos básicos son:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

incubación de la muestra-antígeno, lavado, adición e incubación de conjugado, lavado, adición e incubación de substrato, adición de solución de stop y lectura. La interpretación y validación se hace por comparación con los controles positivos y negativos suministrados por cada casa comercial.

Para la realización de este método de ensayo es necesario seguir las siguientes instrucciones:

- Leer y seguir cuidadosamente las instrucciones de cada método analítico suministradas por el fabricante.
- Usar los kits solamente para diagnóstico in vitro
- Almacenar los kits de reactivos entre 2 y 8°C
- Estabilizar todos los reactivos al menos una hora a temperatura 18-25°C antes de cada uso.
- Se debe verificar ausencia de cristales de precipitación en las soluciones diluyentes y soluciones de lavado. Si se observan cristales, se pueden disolver calentando los recipientes que contienen dichas soluciones a 37°C.
- El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al bote.
- El substrato y la solución de parada deben manipularse con precaución. Se debe evitar contacto con piel, ojos y mucosas. En caso de accidente, enjuagar con abundante agua de grifo.
- No mezclar componentes de diferentes lotes de kits.
- Se debe evitar la contaminación de los reactivos.
- El material de vidrio utilizado durante la ejecución de los ensayos debe estar limpio, sin resto de detergentes.
- No utilice agua que pueda contener oxidantes (por ejemplo, hipoclorito de sodio) o sales de metales pesados, ya que estas sustancias pueden reaccionar con el cromógeno.
- Desechar todas las soluciones contaminadas con bacterias y/o hongos.
- Todos los materiales y equipos desechables que entran en contacto con las muestras deben ser considerados potencialmente infecciosos y eliminados de acuerdo con la legislación vigente en el país.
- Para garantizar la fiabilidad de los resultados, se deben seguir los protocolos.
- Se debe tener especial cuidado en observar los tiempos y temperaturas de incubación, así como medir los volúmenes y las diluciones con precisión.
- Recuerde que algunos componentes de los kits de reactivos son de origen animal, es decir representan riesgo biológico, igualmente otros componentes son sustancias de riesgo químico, así que deben contemplarse las medidas de bioseguridad.
- **NO OLVIDE MARCAR TODOS LOS ELEMENTOS QUE UTILICE DURANTE LA PRUEBA:** Esto incluye recipientes para dispensación /preparación de reactivos, muestras, placas de predilución y placas con antígeno.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS: Cada casa comercial establece los criterios de interpretación de los resultados, los cuales serán informados de acuerdo a dichos criterios.

6.1. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DEL MÉTODO:** Los resultados son válidos cuando cumplen los criterios de validación de cada casa comercial.
- Se deben realizar cartas de control para cada prueba realizada, para cada tipo de control, para cada y para cada analista, en el LBFMT013 Carta Control Ensayos.
- No se deben mezclar reactivos de diferentes lotes para el montaje de pruebas.
- Se realizará confirmación del método de acuerdo al LBPOE009 Aseguramiento de la Validez de los

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Resultados.

- Cada vez que ingrese un nuevo analista y de acuerdo a la DEFMT014 Plan de Trabajo Sistema de Gestión, la supervisión de métodos se debe realizar y registrar en el LBFMT095 Supervisión Métodos Analíticos e informar a la Gerencia General que realizará la autorización siguiendo lo definido en el THPOE001 Relación Contractual.
- En esta prueba es de gran importancia el control de la temperatura y del pH del agua destilada/ desionizada, por esta razón se deben controlar estas dos variables de acuerdo a los procedimientos establecidos por el laboratorio para este fin.
- Diligenciar en cada montaje el LBFMT060 Hoja de Trabajo ELISA.
- Si se evidencian servicios no conformes durante la ejecución del ensayo, se debe registrar en el campo "Observaciones" de las hojas de trabajo la fecha de registro en el LBFMT026 Registro y Tratamiento de SNC.

6.2. RECURSOS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS

- **Equipos:**

  - Lector de ELISA para microplacas de 96 pozos con filtros de longitud de onda 405nm, 450nm y 630nm
  - Incubadora - agitador de ELISA (Temperatura de uso 37 +/-1°C)
  - Agitador de tubos (Vórtex)
  - Lavador de Microplacas ELISA (Opcional)
  - Refrigerador 2-8°C
  - Cabina de Seguridad Biológica Tipo IIA
  - Centrifuga con protección para aerosoles
  - Micro pipeta multicanal de volumen ajustable en el rango 5 a 50ul
  - Micro pipeta multicanal de volumen ajustable en el rango hasta 200 ul o máximo hasta 350ul
  - Micro pipeta mono canal de volumen ajustable en el rango hasta 100 ul
  - Micro pipeta mono canal de volumen ajustable en el rango 100 a 1000 ul
  - Termómetros para medición de temperatura ambiente y para medios isotermos.
  - Cronómetro con alarma audible
  - Pipeteador

- **Insumos**

  - Puntas nuevas para pipetas de 5-300ul
  - Puntas nuevas para pipetas de 100 – 1000 ul
  - Reservorios (Canaletas) para reactivos
  - Placas inertes de ELISA fondo plano
  - Probeta de 100 ml
  - Probeta de 500ml
  - Probeta de 1000ml
  - Pipeta de 1ml
  - Pipeta de 5ml
  - Pipeta de 10ml
  - Agua destilada o desionizada

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- **Reactivos:**

  - Kit de reactivo de cada ensayo: con certificados de análisis.

- **Material De Referencia:**

Sueros de Referencia Nacional o secundarios Positivos y Negativos. Si no hay disponibilidad de Sueros de Referencia Secundarios, utilizar sueros de referencia de trabajo preparados en el laboratorio; la caracterización de estos sueros se encuentra en el formato LB FMT 112 Ficha Técnica Material de Referencia.

El procesamiento del material de referencia se lleva a cabo en el caso que exista: un cambio de analista, cada vez que se comience un kit con lote nuevo y en el caso de que la prueba se deje de realizar en un periodo de meses, se realiza un control de resultados en el formato LB FMT 013 Cartas Control.

- **Elementos De Protección Personal:**

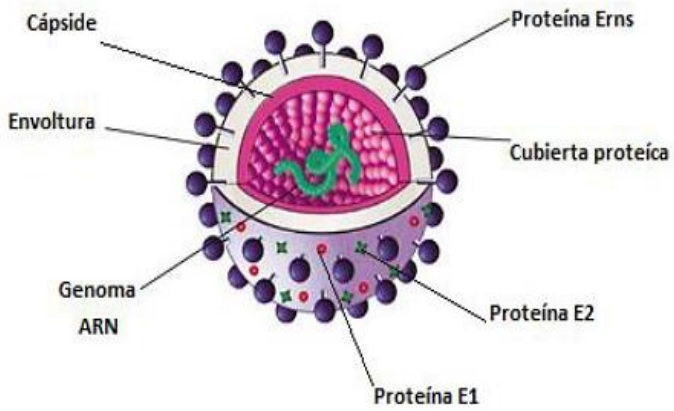
  - Uniforme.
  - Guantes de látex/ Nitrilo
  - Gorro.
  - Tapabocas.
  - Zapato antideslizante
  - Careta

7. BOVINOS, BUFALINOS, OVINOS Y CAPRINOS

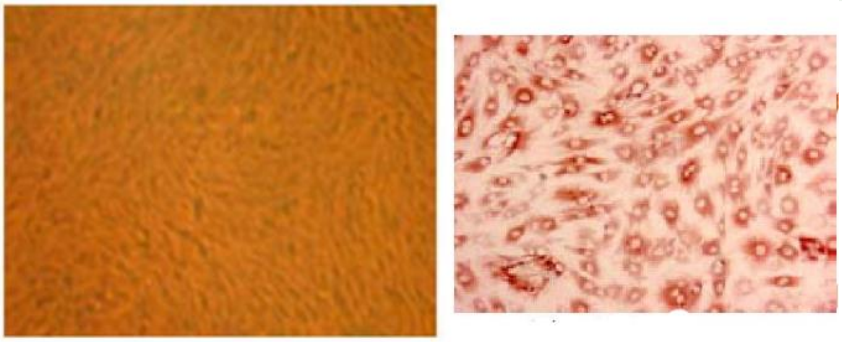
7.1 DIARREA VIRAL BOVINA (DVB)

Es una enfermedad causada por un virus del género pestivirus de la familia Flaviviridae. Presenta forma esférica con un diámetro entre 40 a 60nm y está constituido por una cápside icosaédrica, rodeado de una envoltura lipoprotéica proveniente de la membrana celular. Está constituido por 3 proteínas de envoltura (Erns, E1 y E2) y la proteína de la cápside viral la cual empaqueta el ARN genómico.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

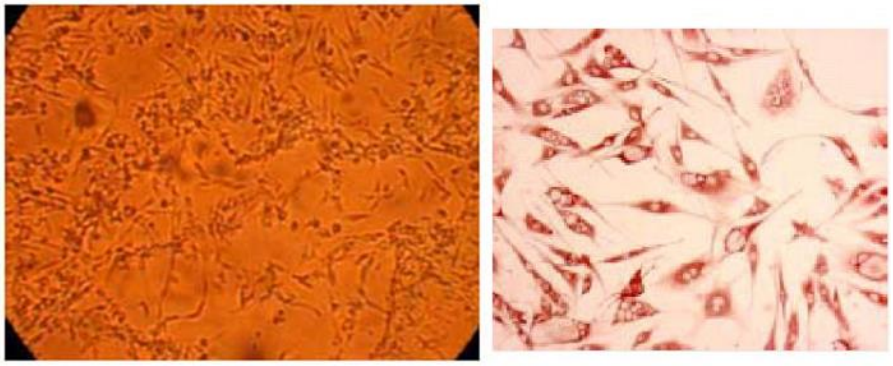


Se pueden distinguir asimismo los biotipos del virus, uno citopático (CP) que causa efecto citopático en cultivo celulares, no genera animales PI e induce apoptosis de las células infectadas y otro no citopático (NCP) que no produce efecto citopático en cultivos celulares, genera animales PI y no induce apoptosis en células infectadas (inhibe INF-I). Las cepas pueden mutar del biotipo NCP al CP. El VDVB presenta un grado muy alto de variabilidad genética y pueden producirse recombinaciones entre cepas.



Cepa No citopática

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



Cepa citopática

La enfermedad puede provocar síntomas comunes (fiebre, falta de apetito, letargo) y afectar además a los sistemas inmunitario, respiratorio, reproductor y digestivo.

- Úlceras en la boca y el tubo digestivo, así como diarrea hemorrágica. Puede producirse una diarrea "tradicional", pero es raro.
- Disminución del rendimiento reproductivo.
- Inmunosupresión que está al origen de las enfermedades respiratorias e intestinales del ternero.
- El VDVB también puede atravesar la barrera placentaria de una vaca gestante e infectar al feto, provocando muertes embrionarias, abortos espontáneos y mortalidad perinatal. Muy importante es su capacidad de provocar el nacimiento de animales persistentemente infectados (PI) que a menudo pueden pasan desapercibidos y que constituyen una gran fuente de infección para el rebaño.

Los factores más importantes en los programas para reducir o eliminar el VDVB son las vacunas, los análisis y la bioseguridad. El objetivo principal de la vacunación de los animales reproductores contra el VDVB es prevenir el nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI), por el riesgo epidemiológico que estos terneros representan para los otros animales del rebaño.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

7.1.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS



1

Infección aguda

Fiebre, complicaciones respiratorias y/o entéricas, leucopenia y trombocitopenia, secreción nasal y ocular.



2

Animales PI

Depende del estado inmune. Son virémicos durante toda su vida y son inmunotolerantes al VDVB.



3

Enfermedad de las mucosas

Diarrea sanguinolenta, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias constantes y leucopenia..

7.1.2 DETERMINACIÓN ACS ANTI DVB POR ELISA

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo de rumiantes	Determinación de anticuerpos anti virus Diarrea Viral Bovina en muestras biológicas de suero sanguíneo de rumiantes por el método ELISA de competición.	INgezim PESTIVIRUS Compac R.12.BVD.K3 Última revisión / Last revisión: 02-0218 # 1054RD

a. <u>Descripción</u>

Ensayo inmunoenzimático de competición para la detección de anticuerpos específicos frente a Pestivirus de rumiantes (BVDV y BDV) en muestras de suero. En la placa de poliestireno se encuentra fijado el antígeno viral inactivado. Cada muestra de suero a ensayar, se dispensa en uno de los pocillos cubiertos con antígeno. En el

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

caso de contener anticuerpos frente a Pestivirus, estos se unirán al antígeno de la placa "Ocupando los determinantes antigénicos específicos". Por el contrario, si no contiene anticuerpos frente a Pestivirus, los determinantes antigénicos específicos, permanecerán "libres".

Para poder revelar las reacciones acontecidas en los pocillos, se utiliza un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa específico para la proteína P80/ P125 de Pestivirus. Este conjugado se añade a cada uno de los pocillos ensayados y "ocuparán" los determinantes antigénicos que hayan quedado libres tras la incubación con el suero problema. Después de eliminar mediante lavados todo resto de material no adherido, y añadiendo a cada pocillo el sustrato adecuado a la peroxidasa, se observará la aparición de una reacción coloreada, allí donde los conjugados hayan encontrado epítopos específicos sin ocupar por los anticuerpos del suero problema.

De este modo los sueros negativos presentarán reacción coloreada en el pocillo a ensayar y los sueros positivos no presentarán esta reacción.

b. Precauciones

- ✓ Leer atentamente las instrucciones de uso
- ✓ Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
- ✓ No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits
- ✓ Evitar cualquier contaminación de los reactivos
- ✓ No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
- ✓ No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
- ✓ No pipetear los reactivos con la boca.
- ✓ Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
- ✓ Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit

IMPORTANTE: El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las condiciones externas, por lo que se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.

La solución de frenado es una solución fuerte, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.

c. Composición del Kit de Elisa

REACTIVO	5 PLACAS	
	Unid	Vol.
Placas de micro titulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo	2 viales	400ul
Viales conteniendo suero Control Negativo	2 viales	400ul
Viales conteniendo conjugado (AcM anti p-80/p125) de Peroxidasa concentrado 100x	2 viales	200ul
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1 frasco	125ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-01)	2 frascos	125ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso	1 frasco	60ml
Frascos conteniendo solución de frenado	1 frasco	60ml

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

d. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-300ul
- Puntas de Micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas
- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 450nm)

e. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y +8ºC) Una vez abiertos, los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizaciones.

f. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una Micro pipeta que permita dispensar la cantidad de 300µL por pocillo. Tras las incubaciones realizar los lavados según las siguientes instrucciones.

PASO 1. Eliminar el contenido de la placa volteándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre pocillos.

PASO 2. Distribuir unos 300µL de solución de lavado por pocillo.

PASO 3. Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

PASO 4. Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido

PASO 5. Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento

PASO 6. Antes de eliminar el contenido del ultimo lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.

PASO 7. Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel absorbente.

g. Preparación De Las Muestras

Para realización de screening, los sueros se utilizarán a la dilución 1/5. (20µL de suero + 80µL de diluyente del suero) es la cantidad necesaria para cada pocillo. En el caso de titulación se realizarán diluciones de factor 2 a partir de la dilución 1/5. **Los controles deben tratarse como las muestras.**

h. Preparación De Los Reactivos

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 1: **Solución de lavado:** Diluir un volumen de solución concentrada en 24 volúmenes de agua destilada, (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua). Una vez preparada la solución permanece estable mantenida entre +2ºC y+8ºC.

PASO 2: Preparación del conjugado: A realizar inmediatamente antes de su utilización: Realizar una dilución 1/100 en diluyente. Para una placa la cantidad necesaria y suficiente es: 60µL de conjugado en 6ml de diluyente. Para una tira la cantidad necesaria y suficiente de conjugado es: 5µL de conjugado en 0,5ml de diluyente. Agitar muy bien la solución antes de su utilización. Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

i. Procedimiento

PASO 1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (Excepto el conjugado) a temperatura ambiente.

PASO 2. Dispensar 20µL de los sueros controles y de las muestras + 80 µl de diluyente en cada uno de los pocillos de la placa, es recomendable en caso de screening que tanto los sueros controles como los sueros problema se ensayen por duplicado. Tapar la placa e incubar **1 hora a 37ºC**

PASO 3. Sin retirar los sueros, añadir 50µL de conjugado preparado según procedimiento descrito, en cada pocillo. Aplicar la placa suavemente para que se mezclen bien los reactivos, teniendo como precaución que no ocurra intercambio de fluidos entre los pocillos. Mantener **1 hora a temperatura ambiente (25ºC).**

PASO 4. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.

PASO 5. Añadir 100µL de sustrato por pocillo, mantener la reacción **15 minutos a temperatura ambiente** y en oscuridad. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal a fin de agilizar lo más posible este proceso.

PASO 6. Añadir 100µL de solución de frenado, con objeto de parar la reacción. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato. La solución de frenado provocará el cambio de azul a amarillo.

PASO 7. Leer a 450nm en los 5 minutos siguientes a la adición de la solución de frenado.

j. Lectura e Interpretación de Resultados

PASO 1. Validación del test:

El test se considera válido cuando

-Abs (Control+) < 0,4
-Abs (Control-) > 0,8

PASO 2. Interpretación de los resultados

- ✓ **Cálculo de Cutt Off:**

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Cutt Off Positivo = 0,5 x Abs media control negativo
- Cutt Off Negativo = 0,55 x Abs media control negativo.

PASO 3. Interpretación de resultados

Si las muestras se analizan por duplicado, deberá calcularse la media de DO de ambos pocillos, las muestras se consideran positivas cuando su valor de absorbancia sea inferior al Cutt Off positivo, y negativas cuando sea superior al Cutt Off negativo.

Los sueros con absorbancia entre ambos Cutt Off serán considerados dudosos y se recomienda que se ensayen de nuevo en un plazo de tres semanas.

En caso de titulación, el título de la muestra será la mayor dilución cuyo valor de absorbancia sea igual o menor que el Cutt Off positivo.

EJEMPLO:

- Abs media del control negativo: 1,300
- Abs media del control positivo: 0,220
- Cutt Off positivo: 1,300x0,5 = 0,650
- Cutt Off negativo: 1,300x0,55=0,715

Diluciones	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
1/5	0,163	0,291	1,235
1/10	0,176	0,412	1,284
1/20	0,211	**0,567**	1,401
1/40	0,325	0,842	1,180
1/80	0,505	1,055	1,320
1/160	**0,617**	1,330	1,324
1/320	0,897	1,284	1,408
1/640	1,222	1,357	1,260

En este caso las muestras 1 y 2 son positivas con un título de 1/160 y 1/20 respectivamente, mientras que la muestra 3 es negativa.

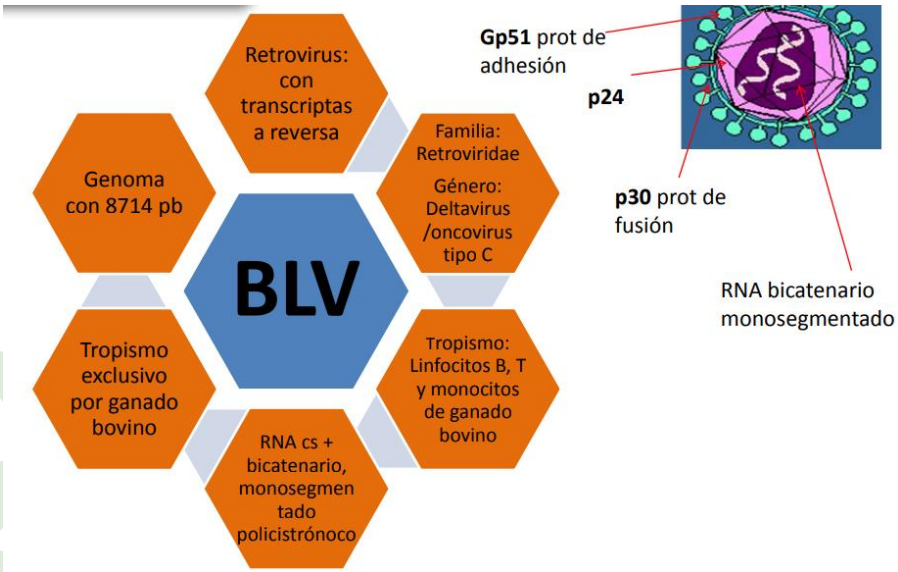
7.2 LEUCOSIS VIRAL BOVINA (LVB) / LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA

La leucosis o leucemia bovina es una enfermedad viral neoplásica que afecta el ganado y se caracteriza por tumores malignos en el tejido linfático (linfosarcomas), el animal presenta baja de pes, baja producción de leche, disminución de la eficiencia de producción de animales, muerte, costos veterinarios y aumento en la tasa de reemplazo.

El agente causal es un oncovirus de la familia *Retroviridae* que se caracteriza por la formación de anticuerpos permanentes. Su incidencia es mayor en los sistemas de producción lechero, por eso países exportadores de lácteos como Australia y Nueva Zelanda tienen programas sanitarios para su control y erradicación. Se caracteriza por la formación de tumores malignos en el tejido linfático.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

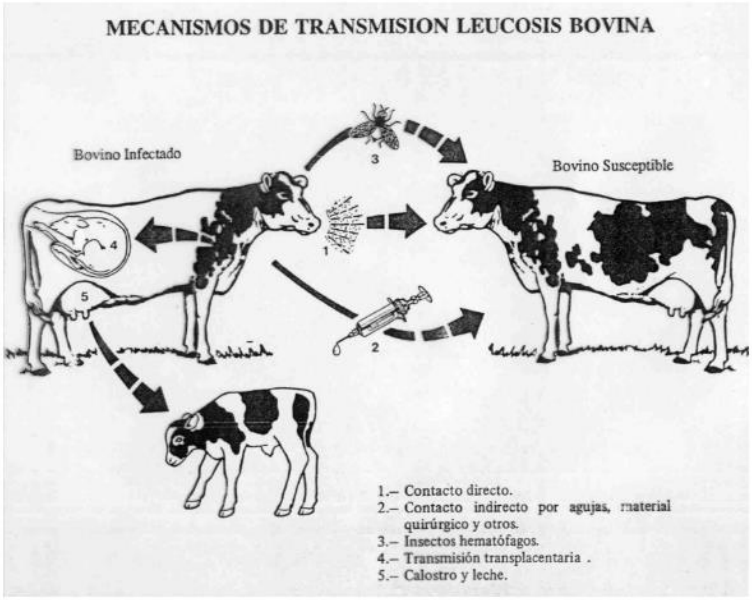
FORMA JUVENIL: Se presenta antes del primer año, involucra casi todos los nódulos linfáticos y órganos viscerales.
FORMA TÍMICA: Bovinos de uno a dos años. Provoca tumor del timo y nódulos linfáticos de cualquier parte del cuerpo.
FORMA ADULTA: Aparece entre los cuatro a ocho años de edad. Localización de los tumores en nódulos linfáticos, riñón, bazo, corazón, cordón espinal en su porción lumbar.



http://www.saludcapital.gov.co/CTDLab/Publicaciones/2016/Virus_Leucosis_Bovina_en_Cancer_de_Mama.pdf

Los signos pueden incluir: alteraciones digestivas, inapetencia, pérdida de peso, debilidad general, disminución de la producción láctea, anemia, manifestaciones neurológicas, baja producción de leche, linfocitosis permanente y postración.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/12064/neosporosis-bovina.html

No existe un tratamiento para la leucosis bovina. Los bovinos infectados albergan el virus durante su vida útil, que sirve como una fuente potencial de infección para otros animales. Los procedimientos recomendados para minimizar la transmisión de BLV incluyen: El uso de agujas desechables y no utilizar la misma aguja para inyecciones en múltiples animales. La desinfección de equipo de tatuaje y los instrumentos quirúrgicos entre los animales. El tratamiento con calor o pasteurización del calostro. El control de moscas que pican (moscas de caballos y las moscas del venado). La comprobación periódica de todos los animales y la eliminación de los animales que tienen anticuerpos contra el virus es el principal método utilizado para controlar la infección BLV en manadas. También es aconsejable agregar al rebaño únicamente animales con resultado negativo.

7.2.1 DETERMINACIÓN ACS ANTI LVB POR ELISA

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo y leche de bovinos	Determinación de anticuerpos anti virus de Leucosis Bovina Enzoótica en muestras biológicas de suero sanguíneo y leche de bovinos por el método ELISA de bloqueo.	INgezim BLV Compac 2.0 R.12.BLV.K3 Última revisión / Last revisión: 21-04-15 N° Registro en España 0808-RD

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

a. Descripción

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la leucosis enzoótica bovina en suero, basado en la utilización de anticuerpos monoclonales específicos de la gp51 del virus de la leucosis enzoótica bovina (LEB). La fase solida está constituida por placas de micro titulación sensibilizadas con gp51 capturadas mediante anticuerpos monoclonales específicos. En el primer paso, se añade la muestra de suero, si ésta contiene anticuerpos específicos de LEB estos seguirán al antígeno capturado en el pocillo. Finalmente, se añade otro monoclonal específico de LEB conjugado con peroxidasa cuya unión al antígeno quedará bloqueada. Tras lavar y añadir el sustrato cromógeno (TMB) no se observará desarrollo de color en el pocillo.
Lo contrario ocurrirá en el caso de muestras de suero negativas a LEB. No existirá bloqueo del anticuerpo monoclonal conjugado y por tanto se desarrollará color en el pocillo.

b. Precauciones

1. Leer atentamente las instrucciones de uso
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
6. No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit
10. **IMPORTANTE:** El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las condiciones externas, por lo que se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.
11. La solución de frenado es una solución fuerte, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua

c. Composición Del Kit De Elisa

REACTIVO	5 PLACAS	
	Unid.	Vol.
Placas de micro titulación de 8*12 pocillos o de 96 pocillos	5	-
Viales de Control Positivo	2	1,5ml
Viales suero Control Negativo	2	1,5ml
Viales de conjugado (100x concentrado)	1	700ul
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1	125ml
Frascos conteniendo diluyente (DE04-01) a la dilución de uso	1	125ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso	1	60ml
Frascos conteniendo solución de frenado	1	60ml

I. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-200ul
- Puntas de Micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas
- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 450nm)

II. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y 8 ºC).

d. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una Micro pipeta que permita dispensar la cantidad de 300µL por pocillo. Tras las incubaciones realizar los lavados según las siguientes instrucciones.

PASO 1. Eliminar el contenido de la placa volteándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre pocillos.

PASO 2. Distribuir unos 300µL de solución de lavado por pocillo.

PASO 3. Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

PASO 4. Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido

PASO 5. Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento

PASO 6. Antes de eliminar el contenido del ultimo lavado, Asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.

PASO 7. Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel absorbente.

e. Preparación De Los Reactivos

PASO 1. Solución de lavado 25x: Diluir una parte de lavado 25x concentrada, suministrada con kit en 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua). Una vez diluida, la solución permanece estable a 4°C.

PASO 2. Sueros controles: Se tratan como las muestras, añadiendo 50µl por pocillo. **¡ATENCIÓN!** Una vez abiertos los controles son estables 1 mes conservados entre +2ºC y+8ºC. Si se prevé su uso a más largo plazo se recomienda su congelación a -20ºC en alícuotas.

PASO 3. Preparación del conjugado: Realizar una dilución 1/100 del conjugado 100x suministrado en el kit con diluyente.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

-10µL de conjugado 100x concentrado en 1 ml de diluyente, es la cantidad necesaria y suficiente para una tira.
- 110µL de conjugado 100x concentrado en 11 ml de diluyente, es la cantidad necesaria y suficiente para una placa completa.

¡ATENCIÓN! Preparar inmediatamente antes de su utilización. Preparar únicamente la cantidad estrictamente necesaria, ya que el volumen sobrante debe ser desechado.

f. Preparación De Las Muestras

Las muestras (suero) pueden ser analizadas individualmente o en mezclas a partes iguales de hasta 10 animales.

g. Procedimiento

PASO 1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (Excepto el conjugado) a temperatura ambiente

PASO 2. Añadir 50µL de diluyente a cada pocillo. Añadir 50µL de los controles positivo y negativo (Es recomendable no poner los controles en las filas exteriores para evitar el efecto borde observado en algunas estufas) y 50µL de cada muestra a testar en cada uno de los pocillos de la placa, para conseguir una dilución 1/2 de las muestras. Es recomendable realizar el ensayo por duplicado. Agitar suavemente para la correcta mezcla de reactivos e incubar una hora a 37ºC.

PASO 3. Lavar 3 veces según procedimiento indicado.

PASO 4. Añadir 100µL de conjugado a cada pocillo, preparado según instrucciones anteriores. Incubar 30 minutos a 37ºC.

PASO 5. Lavar 4 veces según procedimiento indicado

PASO 6. Añadir 100µL de sustrato a cada pocillo. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente (20ºC- 25ºC), en oscuridad.

PASO 7. Añadir 100µL de solución de frenado con objeto de parar la reacción. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato.

PASO 8. Leer a 450nm en los 5 minutos siguientes a la adición de solución de frenado.

h. Lectura E Interpretación De Resultados

PASO 1. Validación del test: Para que este test sea válido:

- El valor de la absorbancia del control negativo ha de ser al menos 5 veces superior al valor de la absorbancia del suero control positivo:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

$$5 < \frac{Absb\ (\ Control-)}{Absb\ (\ Control+)}$$

*El valor de absorbancia del suero control negativo ha de ser mayor de 1.

PASO 2. Interpretación de los resultados

- ✓ **Cálculo de Cutt Off (Punto de corte):**
  - **CUTT OFF (-) =** CN-[(CN-CP) *0,4]
  - **CUTT OFF (+) =** CN-[(CN-CP) *0,5]

- ✓ Siendo: CN= Valor Absb del suero control (-)
  CP= Valor Absb del suero control (+)

PASO 3. Resultado del ensayo: Siendo M el valor de absorbancia de cada muestra:

- ➢ Si M ≥ CUT OFF (-)» Muestra negativa
- ➢ Si M ≤ CUT OFF (+)» Muestra positiva
- ➢ Si CUT OFF (-) > M > CUTT OFF (+)» Muestra dudosa.

En este último caso se recomienda volver a valorar el animal a las tres semanas.

EJEMPLO:

Abs (Control positivo) = 0,154
Abs (Control negativo) = 1,750
Abs (Muestra 1) = 0,170
Abs (Muestra 2) = 1,684

Validación del test:
Abs (Control-) / Abs (Control+) = 11,3 > 5
Abs (Control-) = 1,750 >1

PASO 3. Cálculos de puntos de corte

CUT OFF (-) = 1,750 – [(1,750- 0,154) *0,4] = 1,111
CUT OFF (+) = 1,750 – [(1,750- 0,154) *0,5] = 0,952

PASO 3. Resultados de las muestras:

Absb (Muestra 1) = 0,170 <Cutt Off (+) muestra 1: Positiva
Absb (Muestra 2) = 1,684 >Cutt Off (-) Muestra 2: Negativa

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

7.3 NEOSPOROSIS BOVINA

Neospora caninum es un parásito intracelular obligado de distribución mundial que afecta a cualquier tipo de ganado y a cualquier edad, aunque ha tenido mayor impacto económico en el ganado lechero. La parasitosis en el ganado se caracteriza principalmente por provocar abortos, el nacimiento de becerros clínicamente sanos, pero persistentemente infectados o el nacimiento de becerros débiles y con signos clínicos nerviosos. Los abortos pueden ser endémicos o epidémicos (tormenta de abortos), mayores al 12.5%, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas.

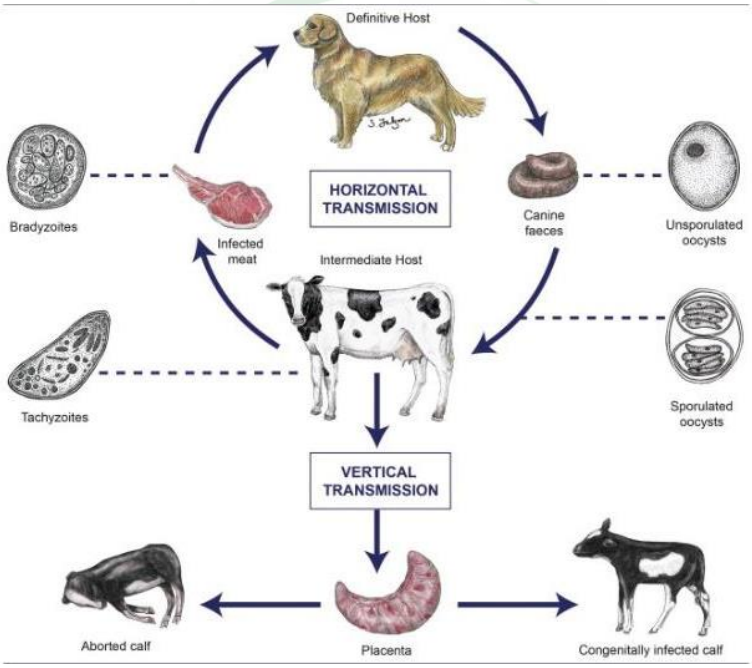
Una forma de transmisión de la parasitosis es la horizontal (transplacentaria exógena) o postnatal, la cual se presenta cuando las vacas consumen alimentos o agua contaminados con ooquistes de *Neospora caninum* que fueron excretados en las heces de perros infectados y que posteriormente esporulan siendo infectantes. Los ooquistes en el intestino, se dividen y se convierten en taquizoitos, los cuales pasan a la sangre (parasitemia) y se alojan en varios tejidos de las vacas permaneciendo latentes. La otra forma de transmisión es la vertical (transplacentaria endógena), la cual se presenta cuando una vaca previamente infectada queda gestante y las condiciones de la gestación como la producción de hormonas (progesterona) y los cambios inmunológicos favorecen la reactivación de parásitos (taquizoitos y quistes con bradizoitos) que ya estaban alojados en sus tejidos. Estas fases parasitarias una vez reactivadas, pasan nuevamente a la sangre y alcanzan a la placenta y al feto infectándolo.

7.3.1 SIGNOS CLÍNICOS Y FACTORES DE RIESGO

Cuando una vaca de cualquier edad infecta a su feto a través de su placenta, pueden suceder tres acontecimientos: uno es que la vaca aborte y éste es el único signo clínico perceptible. El aborto se presenta en cualquier periodo de la gestación, sin embargo, es más frecuente en el segundo tercio de la gestación. No necesariamente en todos los casos se presentará el aborto, sino que aproximadamente el 95% de becerros parasitados que llegan a nacer serán aparentemente saludables, pero persistentemente infectados. El mayor problema de las becerras persistentemente infectadas, es que cuando queden gestantes, los parásitos alojados en sus tejidos se reactivan y se presenta la transmisión vertical nuevamente, por lo cual también tendrán el riesgo de abortar. Por otro lado, sólo un bajo porcentaje de becerros infectados que nacen, aproximadamente el 5%, presentan signos clínicos nerviosos como miembros flexionados o hiperextendidos lo cual provocará dificultad para levantarse, desplazarse y alimentarse, apariencia asimétrica de los ojos, u ojos saltones entre otros.

En algunos estudios epidemiológicos se ha encontrado una relación entre la presencia de perros o el número de perros en los establos lecheros y la cantidad de vacas que resultan positivas a la infección por métodos de diagnóstico serológicos. Con respecto al ganado productor de carne y de doble propósito, todavía no hay evidencia de que la presencia de perros propios o ajenos que se introducen a la unidad de producción, representen un verdadero factor de riesgo, posiblemente debido a que estos bovinos consumen mayor cantidad de forraje verde y menor cantidad de alimento almacenado, disminuyendo la probabilidad del consumo de alimentos contaminados con excretas de perros o cánidos silvestres.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



7.3.2 Determinación de anticuerpos anti *Neospora caninum*

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Suero sanguíneo de bovinos	Determinación de anticuerpos anti *Neospora caninum* en muestras biológicas de suero sanguíneo de bovinos por el método ELISA Indirecta.	INgezim Neospora caninum 3.0 R.12.NC. K1 Última revisión / Last revisión: 14/07/2017 N° Registrado con N° 800 RD

a. Descripción

Este inmunoensayo enzimático (ELISA) se ha desarrollado para detectar la presencia de anticuerpos específicos de *Neospora caninum* en suero bovino. Las muestras de suero se diluyen 1/100 y se incuban durante 60 minutos en los pocillos sensibilizados con antígeno de *Neospora caninum*. Tras un primer lavado, se añade un conjugado anti-IgG bovina y se incuba 60 minutos más. Después de lavar, se añade el sustrato, el cual en caso de reacción positiva desarrollara un color azul. Tras 20 minutos la reacción se frena pasando el color de azul a amarillo y este se cuantifica en un lector de ELISA. El color en los pocillos indica la presencia de anticuerpos específicos de *Neospora caninum.* Cuánto más alta sea la concentración de anticuerpos en la muestra de suero más intenso será el color en el pocillo y por tanto mayo la densidad óptica (DO).

b. Precauciones

1. Leer atentamente las instrucciones de uso
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
6. No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit
10. **IMPORTANTE:** El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las condiciones externas, por lo que se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.
11. La solución de frenado es una solución fuerte, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua

c. Composición Del Kit De Elisa

REACTIVO	5 PLACAS	
	Unid	Vol.
Placas de micro titulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras tapizadas con antígeno de Neospora	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo listo para su uso	1	2,5ml
Viales conteniendo suero Control Negativo listo para su uso	1	2,5ml
Viales conteniendo Conjugado con peroxidasa listo para su uso	2	15ul
Frascos conteniendo diluyente (DE19-01)	2	60ml
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1	125ml
Frascos conteniendo sustrato a la dilución de uso	1	30ml

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Frascos conteniendo solución de frenado	1	65ml

I. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-200ul
- Puntas de Micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas
- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 405nm)

II. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y 8ºC).

d. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una Micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300µL por pocillo. Tras las incubaciones realizar los lavados según las siguientes instrucciones.

PASO 1. Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre pocillos.

PASO 2. Distribuir unos 300µL de solución de lavado por pocillo.

PASO 3. Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

PASO 4. Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido

PASO 5. Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento

PASO 6. Antes de eliminar el contenido del ultimo lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.

PASO 7. Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de absorbente.

e. Preparación De Las Muestras

Diluir las muestras de suero 1/100 utilizando el diluyente DE19-01. Se recomienda realizar esta dilución en dos pasos del siguiente modo: diluir inicialmente en una placa vacía 10µL de suero en 190µL de diluyente y a continuación transferir 10µL de esta dilución a un pocillo de la placa de ELISA que ya contenga 40µL de diluyente DE19-01.

f. Preparación De Los Reactivos

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 1. Solución de lavado: Diluir una parte de solución de lavado 25X concentrada, suministrada con el kit, con 24 partes de agua destilada (40ml de concentrado más 960ml de agua destilada).

PASO 2. Preparación de diluyente: Esta listo para uso, NO DILUIR.

PASO 3. Sueros controles: Están listos para uso. NO DILUIR,

PASO 4. Conjugado: Esta listo para uso, NO DILUIR.

g. Procedimiento

PASO 1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes a temperatura ambiente.

PASO 2. Dispensar 50µL de las diluciones de sueros a testar (preparado según instrucciones anteriores). Añadir a continuación 50µL de los controles positivo y negativo listos para usar. Recomendamos la realización de los controles por duplicado. Tapar la placa e incubar 60 minutos a 37ºC ± 1ºC.

PASO 3. Lavar tres veces con solución de lavado según el procedimiento descrito

PASO 4. Añadir 50µL del Conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar 60 minutos a 37ºC ± 1ºC.

PASO 5. Lavar cuatro veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.

PASO 6. Añadir 50µL de sustrato a cada pocillo, agitar suavemente y mantener la reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente (23ºC ± 2ºC) y en oscuridad.

PASO 7. Añadir 50µL de solución de frenado a cada pocillo en el mismo orden en el que se dispensó el sustrato.

PASO 8. Leer los valores de absorbancia a 450 nm dentro de los siguientes 5 minutos.

h. Lectura E Interpretación De Resultados

PASO 1. Cálculo del Índice de Positividad (IRPC):

Si las muestras y controles se han ensayado por duplicado, hallar la media aritmética de las dos absorbancias obtenidas.

Para calcular el índice IRPC realizar la siguiente operación:

$$IRPC = \frac{(Abs\ Muestra) - (Abs\ Control\ -)}{(Abs\ Control\ +) - (Abs\ Control\ -)} \times 100$$

PASO 2. Validación del test:
El test se considerará válido cuando:

- ✓ Abs C. Pos. – Abs C. Neg. >= 0,4
- ✓ Abs del control negativo < 0,25

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 3. Interpretación de resultados

- IRPC de la muestra ≥ 20 se considera POSITIVO.
- IRPC de la muestra < 17 se considera Negativo.
- IRPC de la muestra entre ambos valores se considera dudoso. Se recomienda recoger una segunda muestra en 2 semanas y repetir el ensayo.

7.4 RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)

La rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) es una enfermedad respiratoria aguda y contagiosa del ganado bovino causada por el herpesvirus de tipo 1 (BHV-1). Afecta fundamentalmente al aparato respiratorio y al reproductor. El herpesvirus de tipo 1 (BHV-1) pertenece a la familia *Herpesviridae*. Es sumamente contagioso y se puede extender rápidamente por un grupo de terneros. Las secreciones de los terneros afectados son extremadamente infecciosas y parecen ejercer una atracción sobre los demás animales. Puede afectar a animales de cualquier edad. Con respecto a la neumonía, suelen estar involucrados otros dos virus: el virus respiratorio sincitial bovino y el virus parainfluenza 3.

Una vez que el BHV-1 ingresa al organismo y se multiplica en el sitio de infección se desplaza a través de prolongaciones nerviosas hacia los ganglios trigémino y sacro, en donde permanece en un estado latente. Esta ubicación del virus fue demostrada usando la técnica de hibridación in situ con sondas radioactivas y, en un trabajo experimental, con la inmunofluorescencia específica. Por otra parte, otros autores informan haber aislado el BHV-1 a partir de muestras de ganglio trigémino provenientes de bovinos adultos que no presentaban signos clínicos de enfermedad. La reactivación del virus puede ocurrir o ser inducida por estímulos naturales o artificiales, como ser: parto, transporte, tratamientos inmunosupresores con corticoides, supe infección con otros virus o microorganismos, irradiación ultravioleta, tratamiento con ciclofosfamida, etc.

Una vez en el organismo el virus replica en el sitio de inoculación para luego diseminarse por medio de la sangre, el sistema nervioso o a través de puentes intercelulares y así alcanzar los órganos blanco. En el sistema nervioso periférico el virus avanza sin estar expuesto a la actividad neutralizante de los anticuerpos, igual que cuando lo hace por medio de los puentes intercelulares. Algunos autores sugieren que los virus son transportados por los leucocitos. A nivel respiratorio, el virus destruye el epitelio del tracto superior lo que, sumado a la inmunosupresión que provoca en el organismo, favorece el asentamiento de infecciones bacterianas secundarias. Entre otros factores, el BHV-1 inhibe la migración de polimorfo nucleares neutrófilos, la citotoxicidad mediada por células y la respuesta mitótica de los linfocitos sanguíneos periféricos, como así también algunas actividades funcionales del macrófago alveolar.

7.4.1 SIGNOS CLÍNICOS

BHV-1 y BHV-5 pueden originar 3 diferentes cuadros clínicos:

a) **Enfermedad respiratoria - Aborto**: La IBR es una enfermedad contagiosa y aguda de los bovinos caracterizada por fiebre (40.5-42ºC) y depresión general, descenso en la producción láctea y emaciación. La virosis afecta el tracto respiratorio superior y las lesiones patológicas suelen describirse como rinotraqueítis necrótica aguda, faringitis y laringotraqueobronquitis. Luego puede complicarse con una invasión bacteriana secundaria y derivar en una bronconeumonía.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

b) **Enfermedad genital**: Un segundo síndrome causado por BHV 1 es la IPV en las hembras o la IPB en los machos, que se caracteriza, en el primero de los casos, por una vulva edematosa e hiperémica en donde se observan pequeñas pústulas diseminadas sobre la superficie mucosa, acompañadas a veces con una descarga vaginal mucopurulenta, pues la invasión bacteriana secundaria es una secuela frecuente. La fase aguda de la enfermedad dura 2-4 días y las lesiones desaparecen 10-14 días después. En los toros, la sintomatología clínica incluye también el área genital en la forma de inflamación de pene y prepucio.

c) **Enfermedad nerviosa**: Los signos neurológicos se caracterizan por depresión, anorexia, ptialismo, amaurosis, rechinamiento de dientes, incoordinación, tremor muscular, ceguera y eventualmente muerte. Muchos de los casos tienen un diagnóstico presuntivo de poliencefalomalasia. La encefalitis usualmente ocurre sin otros signos clínicos de enfermedad por BHV-1.

7.4.2 DETERMINACIÓN ANTICUERPOS ANTI VIRUS IBR

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo de bovinos	Determinación de anticuerpos anti virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en muestras biológicas de suero sanguíneo de bovinos por el método ELISA de bloqueo.	INgezim IBR Compac R.12.IBR.K3 Última revisión / Last revisión: 01-06-18 N° Registro en España 962 RD

a. <u>Descripción</u>

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos frente a la glicoproteína gB del *virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina* en suero bovino.

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos frente al BoHV1 (*Bovine Herpes virus 1)* en ganado bovino afectado de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) o Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV) y es capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos en suero tanto de animales infectados, como de animales vacunados. La base técnica del kit es la del ensayo inmunoenzimático (ELISA) de bloqueo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación.

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) se fija el antígeno de BoHV1. Cuando las muestras de suero se depositan sobre la placa, en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un conjugado específico marcado con peroxidasa (Ac. Monoclonal de la proteína gB del virus). En el caso de que las muestras tuvieran anticuerpos frente a esta proteína, estos no permitirían la unión del conjugado, mientras que, si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el conjugado se unirá libremente al antígeno de la placa.
Tras sucesivos lavados para eliminar el material no unido, podremos revelar las reacciones acontecidas en la

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

placa mediante la adición del sustrato adecuado, el cual desarrollara una reacción colorimétrica en presencia de peroxidasa (es decir en presencia conjugado monoclonal con peroxidasa). De este modo la aparición de una reacción coloreada, indicara que la muestra ensayada no contenía anticuerpos específicos del BoHV1 y la ausencia de color indicara que la muestra es positiva y contiene dichos anticuerpos.

b. Precauciones

1. Leer atentamente las instrucciones de uso
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de distintos kits
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad
6. No comer, beber o fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar un apunta de pipeta nueva por cada muestra a testar
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice un kit
10. **IMPORTANTE:** El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las condiciones externas, por lo que se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen de reactivo que se vaya a utilizar y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.
11. La solución de frenado es una solución fuerte, en caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.

c. Composición Del Kit

REACTIVO	5 PLACAS	
	Unid	**Vol.**
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo para BHV1	2	600ul
Viales conteniendo suero Control Negativo para BHV1	2	600ul
Viales de conjugado (AcM marcado con Peroxidasa) concentrado 100x	2	300ul
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x	1	125ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-01) a la dilución de uso	1	125ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso	1	60ml
Frascos conteniendo solución de frenado	1	65ml

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

I. Otros Materiales Y Reactivos No Incorporados En El Kit

- Agua destilada o desionizada
- Micro pipetas de 5-200ul
- Puntas de micro pipeta de un solo uso
- Dispositivos para el lavado de placas
- Probetas de 50-250ml
- Lector ELISA (filtro de 450nm)

II. Normas Para La Correcta Conservación De Los Reactivos

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y +8ºC) Una vez abiertos, los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizaciones.

d. Información Sobre El Método De Realizar Los Lavados

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una micro pipeta que permita dispensar la cantidad de 300µL por pocillo. Tras las incubaciones realizar los lavados según las siguientes instrucciones.

PASO 1. Eliminar el contenido de la placa volteándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre pocillos.

PASO 2. Distribuir unos 300µL de solución de lavado por pocillo.

PASO 3. Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

PASO 4. Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.

PASO 5. Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento

PASO 6. Antes de eliminar el contenido del ultimo lavado, Asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.

PASO 7. Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel absorbente.

e. Preparación De Las Muestras

Realizar una dilución 1/2 en diluyente. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 50µL de diluyente y luego 50µL de la muestra. Agitar suavemente para una correcta homogenización de la muestra.

f. Preparación De Los Reactivos

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 1. Solución de lavado: Diluir una parte de lavado 25x concentrada, suministrada con kit en 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua)

PASO 2. Sueros controles: Se tratan como las muestras, añadiendo 50µl por pocillo. **¡ATENCIÓN!** Una vez abiertos los controles son estables 1 mes conservados entre +2ºC y+8ºC. Si se prevé su uso a más largo plazo se recomienda su congelación a -20ºC en alícuotas.

PASO 3. Preparación del conjugado: Realizar una dilución 1/100 del conjugado 100x suministrado en el kit con diluyente.

-10µL de conjugado 100x concentrado en 1ml de diluyente, es la cantidad necesaria y suficiente para una tira.
- 110µL de conjugado 100x concentrado, en 11ml de diluyente, es la cantidad necesaria y suficiente para una placa completa.

¡ATENCIÓN! Preparar inmediatamente antes de su utilización. Preparar únicamente la cantidad estrictamente necesaria, ya que el volumen sobrante debe ser desechado.

g. <u>Procedimiento</u>

PASO 1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (Excepto el conjugado) a temperatura ambiente

PASO 2. Adición de sueros:

- Añadir 50µL de diluyente a cada uno de los pocillos que se vayan a utilizar.
- Anadir otros 50µL de suero control positivo a dos pocillos marcados y 50µL de suero control negativo a otros dos pocillos marcados. Rellenar el resto de los pocillos con 50µL de los sueros problemas a ensayar. Utilizar una punta limpia para cada muestra.

PASO 3. Tapar la placa e incubar **durante 1 hora a 37ºC**

PASO 4. Lavar cinco veces según el procedimiento descrito anteriormente.

PASO 5. Añadir 100µL del conjugado preparado según se especifica en apartado **f**, a cada pocillo. Tapar e incubar 30 min a 37ºC.

PASO 6. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.

PASO 7. Añadir a cada pocillo100µL de sustrato incubar durante **15 minutos a temperatura ambiente** en oscuridad. (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).

PASO 8. Añadir 100µL de solución de frenado a cada pocillo. ¡ATENCIÓN! La solución de frenado ha de dispensarse en el mismo orden en que se añadió la solución de sustrato.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

PASO 9. Leer los valores de absorbancia a 450 nm en los 5 minutos siguientes a la adición de la solución de frenado.

h. <u>Lectura E Interpretación De Resultados</u>

PASO 1. Validación del test: El test se considera válido cuando

- El valor de absorbancia (D0 450nm) del suero control negativo debe ser mayor a 0,750.
- Ha de cumplirse la siguiente relación:
  Control positivo/ control negativo < 0,3

PASO 2. Interpretación de los resultados: En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la media aritmética de los dos valores DO obtenidos. Igualmente se realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para control positivo y los dos pocillos para control negativo.

Para cada una de las muestras se calculará el porcentaje de bloqueo, aplicando la siguiente formula:

$$\text{PORCENTAJE DE BLOQUEO (PB)} = \frac{\text{DO control negativo – DO Muestra}}{\text{DO control negativo – DO control positivo}} \times 100\%$$

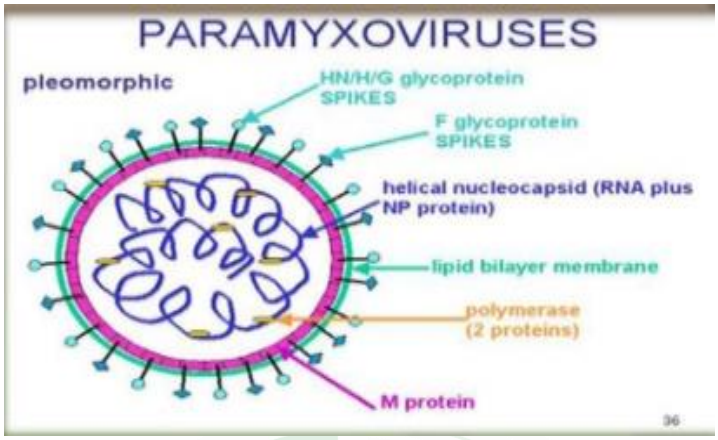
SUERO

- Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a BoHV1) cuando su porcentaje de bloqueo sea igual o superior al 30%
- Las muestras se considerarán **NEGATIVAS** (Ausencia de anticuerpos frente a BoHV1) cuando su porcentaje de bloqueo sea igual o inferior al 25%
- Las muestras que presenten porcentajes de bloqueo entre ambos valores se considerarán **DUDOSAS** y en estos casos se recomienda testar de nuevo el animal transcurridas 3 semanas.

7.5 PARAINFLUENZA 3

El virus de la Parainfluenza 3 (PI3) pertenece a la familia de los *Paramyxovirus*, agente también involucrado en la neumonía enzoótica de los terneros. Se requieren de 2 a 4 días para que un animal susceptible comience a mostrar signos clínicos. En un brote de enfermedad respiratoria aguda, es de esperar una tasa de infección del 100 %, morbilidad del 20 al 50 % y mortalidad menor al 5%.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión



Esta enfermedad ocurre con mayor frecuencia en los becerros destetados y estabulados, entre las 2 semanas y 5 meses de edad. Es de alta morbilidad y puede alcanzar hasta un 30% de mortalidad en las becerras de reemplazo. La principal vía de transmisión es por medio de aerosoles y por el contacto directo entre animales enfermos y sanos por lo que esto se acentúa en condiciones de hacinamiento y mala ventilación. Los factores de riesgo ambientales son los cambios bruscos de temperatura, la humedad relativa, la calidad del aire y la alta densidad de población. El mayor riesgo de la PI3 es que puede haber una invasión secundaria por bacterias o micoplasmas. La presentación subclínica y sin complicaciones bacterianas, tiene poca importancia.

En la enfermedad respiratoria leve se presenta tos, polipnea, secreción nasal y fiebre moderada. En la forma grave los signos son disnea polipneica intensa, respiración por la boca, cabeza gacha, quejido respiratorio y puede sobrevenir la muerte. La única forma de prevenir esta afección, es mediante la vacunación. Se recomienda inmunizar a los animales a partir de las 4 semanas de nacidos y revacunar entre 3 y 5 semanas.

7.5.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI VIRUS PARAINFLUENZA 3

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

O PRODUCTO A ENSAYAR		
Suero sanguíneo	Determinación de anticuerpos anti virus Parainfluenza 3 en muestras biológicas de suero sanguíneo, plasma y leche de bovinos por el método ELISA indirecta.	BIO-X Diagnostics. Monoscreen ELISA. Kit ELISA para serodiagnóstico del virus de la parainfluenza 3 bovina (BPI3). Ensayo indirecto para sueros sanguíneos, plasma y leche. Prueba diagnóstica para el ganado. Pozos dobles V 2.2 (23/10/2015)

a. Descripción

Parainfluenza 3 se aisló por primera vez en los Estados Unidos a partir del moco nasal de ganado que mostraba signos clínicos de fiebre de embarque. Su distribución en el ganado se ha encontrado en todo el mundo. La mayoría de los informes sobre la actividad del virus PI3 bovino han sido en grupos de bovinos jóvenes con enfermedades respiratorias como la neumonía enzoótica de los terneros y la fiebre del transporte.

Las infecciones por el virus PI3 bovino no se asocian invariablemente con la enfermedad, y frecuentemente ocurren infecciones subclínicas. En países europeos, la infección por BPI3 ocurre principalmente durante los meses de octubre a marzo. La infección por el virus BPI3 puede ir acompañada de infección concurrente del tracto respiratorio por otros virus como virus respiratorio sincitial, adenovirus o BVDV. En los brotes de enfermedad respiratoria bovina, no es posible diagnosticar la infección por el virus BPI3 solo por evidencias clínicas. Para establecer un diagnóstico, es necesario tomar sueros pareados de animales infectados o enviar animales del brote para necropsia para facilitar los análisis inmunocitoquímicos de las vías respiratorias inferiores. La infección por el virus BPI3 en un brote de enfermedad respiratoria puede ser detectada por la demostración de un aumento en el título de anticuerpos séricos al virus entre la fase aguda y convaleciente (seroconversión).

a) principio De La Prueba

La prueba utiliza placas de microtitulación de 96 pocillos sensibilizadas por el virus BPI3 purificado. Las columnas impares de la placa (1, 3, 5, 7, 9 y 11) contienen el virus, mientras que las columnas pares (2, 4, 6, 8, 10 y 12) contienen un antígeno de control. Los sueros de sangre de ensayo y el plasma se diluyen en el tampón de dilución. Las muestras de leche se utilizan sin diluir. La muestra se añade a la placa que se incuba y se lava. El conjugado, proteína G marcada con peroxidasa, se añade a los pocillos. La placa se incuba una segunda vez a 21ºC +/- 3ºC. Después de la segunda incubación, la placa se lava de nuevo y se añade el cromógeno (tetrametilbencidina). Este cromógeno tiene la ventaja de ser más sensible que los otros cromógenos peroxidasa y no cancerígenos. Si las inmunoglobulinas específicas PI3 están presentes en la muestra de suero o leche, el conjugado permanece unido al micropocillo que contiene el antígeno viral y la enzima cataliza la transformación del cromógeno incoloro en un pigmento compuesto. La intensidad del color azul resultante es proporcional al título de anticuerpo específico de la muestra. La lectura del de control negativo se resta de la del control positivo sensibilizada por el antígeno viral. Es posible cuantificar la reactividad de una muestra desconocida en una escala que varía de 0 a +++++.

b. Composición Del KIT

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Microplacas: Dos placas de microtitulación de 96 pocillos (12 tiras de 16 pocillos). Las columnas impares (1, 3, 5, 7, 9 y 11) son sensibilizados por el antígeno viral PI3 y las columnas pares (2, 4, 6, 8, 10 y 12) por el control.
- Solución de lavado: Una botella de 100 ml de solución de lavado concentrada 20x. La solución cristaliza espontáneamente cuando está frío. Si sólo se va a utilizar una parte de la solución, llevar la botella a 21 ° C +/- 3 ° C hasta que todos los cristales han desaparecido. Mezclar bien la solución y eliminar el volumen necesario. Diluir el tampón 1:20 con agua destilada o desmineralizada.
- Tampón de dilución: Una botella de 30 ml de tampón coloreado y concentrado 5x para diluir el suero sanguíneo, el plasma y el conjugado. El contenido de la botella debe diluirse con agua destilada o desmineralizada. Si un depósito en la parte inferior del receptáculo, filtrar la solución en papel de filtro Whatman.
- Conjugado: 1 botella de Proteína G marcada con peroxidasa de rábano picante.
- Referencia positiva: Una botella de suero positivo. Guarde este reactivo entre + 2 ° C y + 8 ° C.
- Referencia negativa: Una botella de suero negativo. Guarde este reactivo entre + 2 ° C y + 8 ° C.
- Trazador: Una botella de trazador. Reconstituir este reactivo con 0,5 ml de agua destilada o desmineralizada. Una vez reconstituido, el reactivo se almacena a -20 ° C. Divida este reactivo en varias porciones antes de congelarlo. Evitar ciclos repetidos de congelación / descongelación. Si se toman estas precauciones, el reactivo puede mantenerse durante varios meses. El trazador es una muestra de referencia que se puede utilizar para comprobar la reproducibilidad intra-laboratorio de kits del mismo lote.
- Reproducibilidad intra-laboratorio: Grado de concordancia entre los resultados de pruebas repetidas en la misma muestra con un protocolo técnico idéntico en un laboratorio dado bajo condiciones de trabajo variables.
- Un componente único TMB: Una botella de 25 ml del cromógeno Tetrametilbencidina (TMB). Almacene entre + 2 ° C y + 8 ° C protegido de la luz. Esta solución está lista para usar.
- Solución de parada: Una botella de 15 ml de la pho 1 M

REACTIVO	BIO K 239/2
Microplacas	2
Solución de lavado	1 x 100 ml (20 X)
Tampón de dilución coloreado	1 x 30 ml (5 x)
Conjugado	1 x 0,5 ml (50 x)
Suero positivo	1 x 0,5 ml (1 x)
Suero negativo	1 x 0,5 ml (1 x)
Trazador	1 x 0,5 ml (liofilizado)
TMB componente único	1 x 25 ml (1 x)
Solución de parada	1 x 15 ml (1 x)

c. Material Y Material Adicional Requerido

- Agua desionizada.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- Probetas.
- Vasos de precipitado.
- Tubos de plástico.
- Gradillas para tubos.
- Microplacas para dilución.
- Dispensadores.
- Depósito de reactivos para pipetas multicanal.
- Adhesivo para microplacas, (mono canales y multicanal).
- Lector de microplacas.
- Lavador de microplacas (opcional).
- Agitador de microplacas (opcional)

d. <u>Procedimiento</u>

PASO 1. Atemperar todos los componentes a 21 ° C +/- 3 ° C antes de su uso. Retire la microplaca de su envoltura.

PASO 2. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS 2.1- Sueros sanguíneos y preparación de plasma Las muestras de suero y plasma sanguíneo deben diluirse 1: 100. Evite el uso de muestras hemolizadas o las que contengan coágulo.

- ✓ Dilución en tubos: Distribuir alícuotas de 990 µl de tampón de dilución, preparadas como se indica en la sección "Composición del kit", a tubos de 5 ó 10 ml. Añadir alícuotas de 10 µl de las muestras a cada uno de estos tubos y mezclar brevemente en un agitador mecánico (dilución final: 1: 100).
- ✓ Dilución en microplaca Distribuir alícuotas de 20 µl de cada una de las muestras en los micropocillos de una placa de dilución. Añadir 180 µl de tampón de dilución. Mezclar cinco veces por bombeo y agitación o agitación orbital (dilución: 1:10). Distribuir alícuotas de 90 µl de tampón de dilución a los pocillos de la microplaca del kit. Transferir 10 µl de las muestras 1:10 pre diluidas. Mezclar cinco veces por pipeteo y agitación o agitación orbital (dilución final: 1: 100).

PASO 3. Dilución de los sueros de referencia del kit (controles positivo y negativo) y trazador. Los sueros positivos y negativos y el trazador deben diluirse 1: 100. Hacer estas diluciones en un solo paso en un tubo (véase el PASO 2 Dilución en tubos) o en dos pasos en una microplaca de dilución (véase el PASO 2 Dilución en microplaca).

PASO 4. Preparación de la leche. Centrifugar a 4000 g durante 20 minutos. Tomar la capa media de líquido por medio de una pipeta Pasteur de vidrio introducida a través de la capa superior de crema, teniendo cuidado de no tocar el sedimento celular subyacente. Utilice muestras de leche desnatada sin diluir en los pozos.

PASO 5. Distribuya las muestras (suero sanguíneo, plasma o leche) en cantidad 100 µl por pocillo. Por ejemplo, se puede seguir el siguiente patrón: Suero positivo en los pocillos A1 y A2, suero negativo en los pocillos B1 y B2, trazador en los pocillos C1 y C2, Muestra 1 en los pocillos D1 y D2, y así sucesivamente. Cubrir con una tapa e incubar la placa en 21 ° ± 3 ° C durante una hora.

PASO 6. Enjuagar la placa con la solución de lavado preparada como se indica en la sección "Composición del kit". Al eliminar el contenido de la microplaca volteándola bruscamente sobre un recipiente lleno de un agente inactivante. Seque la microplaca invirtiéndola sobre una hoja de papel absorbente limpio para eliminar todo el líquido. Añadir 300 µl de la solución de lavado, y luego vaciar la placa una vez más volteándola por encima del

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

recipiente de contención. Repita la operación completa dos veces más, teniendo especial cuidado para evitar burbujas formación en los pozos. Después de estos tres enjuagues, continúe con el siguiente paso. También se recomienda usar una lavadora de placas (automática o manual). Sin embargo, la profundidad de la inmersión de las agujas debe fijarse de modo que no perturbe la capa de reactivos adsorbida al fondo de cada pocillo.
También puede utilizarse un lavador automático de placas, pero en este caso debe evitarse el contacto entre las agujas y el fondo de los pocillos que pueda originar cualquier daño de la capa reactiva.

PASO 7. Diluir el conjugado 1:50 en el tampón de dilución (por ejemplo, para una placa diluir 250 µl del conjugado en 12,250 ml de diluyente). Añadir 100 µl de la solución de conjugado diluido a cada pocillo. Cubrir con un tapar e incubar la placa a 21 ° ± 3 ° C durante una hora.

PASO 8. Lave la placa como se describe en el paso 6.

PASO 9. Añadir 100 µl de la solución de cromógeno a cada pocillo de la placa. La solución de cromógeno debe ser absolutamente incolora cuando se pipetea en los pocillos. Si un color azul es visible, esto significa que la solución se ha contaminado.

PASO 10. Incubar durante 10 minutos a 21 ° C +/- 3 ° C protegido de la luz y descubierto. Este tiempo se da como solo como una guía ya que en algunas circunstancias puede ser útil alargar o acortar el tiempo de incubación.

PASO 11. Añadir 50 µl de solución de parada por micropocillo. El color azul cambiará a un color amarillo.

PASO 12. Leer las densidades ópticas en los micropocillos usando un lector de placas y un filtro de 450 nm. Los resultados deben leerse bastante pronto después de que se ha añadido la solución de parada ya que el cromógeno puede cristalizar en pocillos con señales fuertes y distorsionar así los datos.

e. Interpretación De Resultados

Reste de cada lectura obtenida en las columnas impares la lectura del pozo control negativo correspondiente y registre el resultado (Delta). Al realizar este cálculo, tenga en cuenta que pueden existir valores negativos. Llevar a cabo la misma operación para la columna correspondiente a los controles positivo y negativo. La prueba puede ser validada sólo si el suero positivo produce una diferencia en la densidad óptica a los 10 minutos que es superior a 0,800 y el suero negativo produce una diferencia de densidad óptica inferior a 0,300 Divida la lectura de cada muestra entre la lectura del suero de control positivo y multiplique este resultado por 100 para expresarlo como un porcentaje.

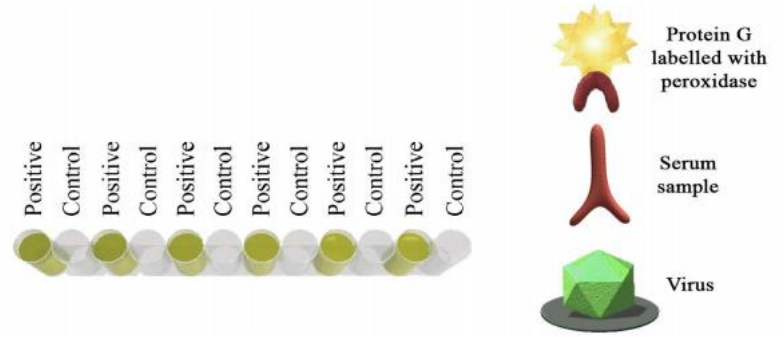
VALOR (PP): $\frac{\text{Delta OD Muestra} * 100}{\text{Delta OD positivo}}$

Utilizando la siguiente tabla, determine el grado de positividad de cada suero.

0		+		++		+++		++++		+++++
Val <=	20 %	< Val <=	40 %	< Val <=	60 %	< Val <=	80 %	< Val <=	100 %	< Val

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

Un diagnóstico fiable sólo puede hacerse si la seroconversión franca puede documentarse utilizando dos muestras de suero tomadas a intervalos de 2 a 3 semanas. La primera muestra debe tomarse durante la fase aguda de la infección. Se considera que una seroconversión franca se ha producido si la señal aumenta en dos órdenes de magnitud (dos más, por ejemplo, ++ -> ++++ o + -> +++). Una muestra debe ser considerada positiva si produce un resultado que es mayor o igual que (+).



7.6 *MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS*

SUSTANCIA, MATERIAL, ELEMENTO O PRODUCTO A ENSAYAR	ENSAYO	DOCUMENTO NORMATIVO (NORMA/AÑO)
Suero sanguíneo y leche de bovinos, ovinos o caprinos	Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos específicos de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* por el método ELISA indirecta.	*Mycobacterium paratuberculosis* Test Kit PARACHEK® 2. Ensayo indirecto para sueros sanguíneos y leche. Prueba diagnóstica para el ganado.

La enfermedad de Johnes o Paratuberculosis es una enteritis crónica de los rumiantes causada por la infección de *Mycobacterium paratuberculosis*. Durante la fase activa de la infección y antes de aparecer sintomatología clínica, los animales generalmente desarrollan anticuerpos específicos de *M. paratuberculosis*. Los animales no infectados carecen de este tipo de anticuerpos, pero pueden tener reacciones cruzadas con otras *Mycobacterias*. Este ensayo muestra alto rendimiento, detectando anticuerpos específicos de *M. paratuberculosis* en suero, plasma y leche y puede ser utilizado como test específico de la enfermedad de Johnes en ganado vacuno. Este test ha sido evaluado con animales procedentes de zonas endémicas afectadas por Paratuberculosis y de zonas libres en Australia y Estados Unidos. La especificidad del test fue del 99% o mayor para ganado bovino, ovino y caprino. Los cálculos de sensibilidad en vacas se ven afectados por la historia de granja en estudio. No obstante, el ELISA es capaz de detectar hasta un 80% de animales antes de la aparición de síntomas clínicos y entre el 60-65% de secretores fueron positivos en o antes de la primera detección en cultivo de heces en ovejas, la sensibilidad estimada del test es del 38- 44%4 y para cabras del 65-88%. El test permite estudios epidemiológicos y es una herramienta útil en el manejo y control de la enfermedad de Johnes en ganado bovino, ovino y caprino.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

a. Principio del ensayo

El test consiste en cuatro pasos:

Paso 1 Las muestras de suero o leche son diluidas e incubadas en diluyente verde conteniendo M. phlei para eliminar los anticuerpos que puedan dar lugar a reacción cruzada.

Paso 2 Las muestras diluidas se añaden a la placa recubierta con antígeno de M. paratuberculosis. Los anticuerpos no específicos se eliminan mediante un paso de lavado después de la incubación.

Paso 3 El conjugado (IgG anti bovina marcada con peroxidasa) reacciona con las inmunoglobulinas unidas al antígeno y el sobrante se elimina mediante lavado después de la incubación

Paso 4 Adición de substrato. La velocidad de conversión del substrato es proporcional a la cantidad de inmunoglobulina presente. La reacción se para con solución de parada y el desarrollo de color se mide fotométricamente

b. Componentes del kit

Conservar el kit a 5±3°C hasta su fecha de caducidad. Ver etiqueta para fecha de caducidad. La caducidad de los reactivos diluidos, abiertos, o reconstituidos se indicará cuando sea necesario. Los datos de seguridad de los reactivos, están disponibles en la sección correspondiente.

Referencias de producto
Kit de dos (2) placas: 63327
Kit de cinco (5) placas: 63325
Kit de treinta (30) placas: 63328

Componente 1 Placas con el antígeno (M. paratuberculosis).
63327: 2 x 96 pocillos con tapas
63325: 5 x 96 pocillos con tapas
63328: 30 x 96 pocillos con tapas Listas para usar.

Componente 2 Control Positivo
63327: 1 x 0.75 ml
63325: 1 x 1.0 ml
63328: 1 x 2.0 ml
Contiene 0.01% p/v thimerosal. Listo para usar.

Componente 3 Control Negativo
63327: 1 x 0.75 ml
63325: 1 x 1.0 ml
63328: 1 x 2.0 ml
Contiene 0.01% p/v thimerosal. Listo para usar.

Componente 4 Diluyente verde: Tampón de dilución de muestras Contiene 0.01% p/v thimerosal.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

63327: 1 x 100 ml
63325: 1 x 250 ml
63328: 3 x 500 ml Listo para usar.

Componente 5 Solución de Lavado – 20x Concentrada
63327: 1 x 100 ml
63325: 1 x 250 ml
63328: 2 x 500 ml Contiene 0.01% p/v thimerosal. Diluir con agua destilada

Componente 6 Conjugado – 100x Concentrado (Ig anti-bovina marcada con Peroxidasa.)
63327: 1 x 0.5 ml
63325: 1 x 0.75 ml
63328: 2 x 2.0 ml Contiene 0.01% p/v thimerosal. Diluir con diluyente azul.

Componente 7 Diluyente azul: Tampón de dilución de conjugado
63327: 1 x 30 ml
63325: 1 x 75 ml
63328: 2 x 200 ml Contiene 0.01% p/v thimerosal. Listo para usar.

Componente 8 Substrato
63327: 1 x 30 ml
63325: 1 x 75 ml
63328: 2 x 200 ml Contiene solventes orgánicos. Listo para usar.

Componente 9 Solución de Parada
63327: 1 x 15 ml
63325: 1 x 50 ml
63328: 1 x 200 ml (0.5M H_2SO_4) Listo para usar.

c. Precauciones generales

1. Seguridad en Laboratorio Deben seguirse en todo momento los procedimientos de seguridad establecidos.
2. Solución de Parada Es un ácido fuerte. Despeje el área derramada inmediatamente y lávela con abundante agua. Si la solución de frenado entra en contacto con la piel o los ojos, aplique abundantes cantidades de agua y solicite atención médica.

d. Equipamiento Necesario

• Pipetas de precisión de volumen variable (475 µl, 25 µl y 10 a 120 µl)
• Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
• Probetas o vasos de 100 ml, 1 litro y 2 litros
• Lavador/dispensador apropiado
• Agitador de placas
• Pipeta multicanal (volúmenes de 50 y 100 µl)
• Lector de placas. Este lector DEBE ser ajustado con filtros de 450 nm y 620-650 nm.
• Placa vacía utilizada para diluciones de la muestra (ej. Placa transparente de 96 pocillos con fondo en U) o equivalente no tapizada.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

e. Preparación de reactivos

1. Placas con el antígeno (M. paratuberculosis). Dejar que se equilibren a temperatura ambiente (22±3°C) durante al menos 30 minutos antes de abrir la bolsa de plástico.
2. Controles Positivo y Negativo Llevar a temperatura ambiente (22±3°C) y agitar bien para homogenizar la solución.
3. Diluyente verde Tampón de dilución de muestras. Llevar a temperatura ambiente (22±3°C) y agitar bien antes de usar. (Listo para usar).
NOTA: Se requieren más de dos horas para que la botella de este reactivo llegue a temperatura ambiente. Si no hay tiempo suficiente para atemperar, se debe utilizar un baño de temperatura ambiente.
4. Diluyente azul Tampón de dilución de conjugado. Llevar a temperatura ambiente (22±3°C) y agitar bien antes de usar. (Listo para usar).
5. Conjugado 100x Concentrado El conjugado 100x Concentrado DEBE conservarse a 5±3°C siempre.
6. Preparación del conjugado Llevar el diluyente azul a temperatura ambiente (22±3°C) y agitarlo bien. Realizar una dilución 1/100 del conjugado 100x suministrado en el kit con el diluyente azul previamente atemperado para obtener la dilución lista para usar, (Ver tabla de preparación de conjugado). Almacenar el conjugado 100x a 5±3°C inmediatamente después de su uso.
7. Solución de Lavado – 20x Concentrada Mezclar una parte de la solución de lavado concentrada 20x con 19 partes de agua desionizada. La solución de lavado resultante puede almacenarse a temperatura ambiente (22±3°C) durante 2 semanas.
8. Substrato Llevar a temperatura ambiente (22±3°C) durante 30 minutos antes de utilizar. Listo para usar. El sustrato debe ser transparente y claro. Descartar si aparece coloración azul o cualquier evidencia de precipitación. Depositar el volumen requerido en un tubo para su uso. No pipetear de la botella y no devolver el resto de lo utilizado.
NO UTILICE CONTENEDORES O PIPETAS DE POLIESTRIENO.
Cualquier recipiente usado para los reactivos del sustrato debe lavarse sucesivamente con SO4H2 1N ó HCl y al menos tres veces con agua destilada para asegurarse de que no queda ningún resto del ácido. Proteger el reactivo de la luz y de la evaporación.

TABLA DE PREPARACIÓN DE CONJUGADO (TABLA 1)

Número de tiras	Volumen de concentrado	Volumen de diluyente
1	10 µl	1 ml
2	20 µl	2 ml
3	30 µl	3 ml
4	40 µl	4 ml
5	50 µl	5 ml
6	60 µl	6 ml
7	70 µl	7 ml
8	80 µl	8 ml
9	90 µl	9 ml
10	100 µl	10 ml
11	110 µl	11 ml
12	120 µl	12 ml

f. Notas del Procedimiento

1. Atemperar (22±3°C) todos los reactivos excepto el conjugado 100x durante al menos 30 minutos antes de

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

usar. NOTA: Ver requerimientos especiales para el Diluyente Verde.
2. Todos los componentes del kit deben conservarse a 5±3°C. Volver a almacenar a 5±3°C inmediatamente después de usar. La solución de lavado puede almacenarse a temperatura ambiente durante 2 semanas. 3. El conjugado 100x concentrado debe conservarse a 5±3°C siempre.
4. Utilizar una punta desechable diferente para cada muestra para evitar contaminaciones.
5. Las muestras deben ensayarse por duplicado en pocillos adyacentes.
6. El ensayo ha sido validado para muestras de suero, plasma y leche fresca, congelada o entera. No utilizar calostro o leche de la primera semana. Las leches se analizan a dilución 1/2; los sueros y los controles se utilizan a dilución 1/20.
7. Los controles positivo y negativo deberán ser analizados por duplicado. Se recomienda situarlos al principio de la placa (Ej. en los pocillos A1/B1 los controles positivos y en C1/D1, los controles negativos.

g. Procedimiento del ensayo

1. Atemperar todos los componentes del kit (excepto el conjugado).
2. Diluir las muestras de suero 1/20 y de leche ½ en diluyente verde en una placa de trabajo. Ej. 15 µl de suero o controles en 285 µl de diluyente verde si el ensayo es por duplicado o 10 µl de muestra más 190 µl de diluyente verde si el ensayo es individual, o 150 µl de leche en 150 µl de diluyente verde si el ensayo es por duplicado. Mezclar bien ya sea con pipeta o con agitador de placas al menos un minuto a velocidad moderada. La reacción entre la muestra y el diluyente verde puede mantenerse desde 1 min. hasta 24 horas.
3. Transferir 100 µl de las muestras test y de los controles de la placa de trabajo a los pocillos correspondientes de la placa test tapizada con M. paratuberculosis.
4. Cubrir e incubar 30±3 minutos a temperatura ambiente (22±3°C). El conjugado 100x concentrado deberá diluirse a la dilución de uso una vez terminado el paso de lavado. En caso de realización del ensayo de forma automatizada, el conjugado puede ser utilizado hasta 8 horas a temperatura ambiente después de haber sido preparado (22±3°C).
5. Vaciar los pocillos y lavar 3 veces con 300 µl solución de lavado. Se recomienda utilizar un lavador automático de placas con un programa apropiado de lavado. En caso de lavado a mano, se recomienda tener precaución de no contaminar los pocillos adyacentes. Sacudir los pocillos suficientemente para eliminar la solución de lavado después de cada ciclo de lavado. Después del último ciclo de lavado. Situar las placas bocabajo sobre un papel de filtro limpio material similar para eliminar la solución de lavado de los pocillos.
6. Añadir 100 µl del conjugado recién diluido (ver tabla 1), a cada pocillo y agitar la placa.
7. Tapar las placas e incubar a temperatura ambiente (22±3°C) durante 30±3 minutos.
8. Lavar según procedimiento descrito en el paso 5.
9. Añadir 100 µl de la solución de sustrato recién preparada en cada pocillo.
10. Tapar las placas, agitarlas e incubar a temperatura ambiente (22±3°C) durante 15-20 min.
11. Añadir 50 µl de la solución de frenado a cada pocillo. Luego mezclar agitando cuidadosamente.
NOTA: La solución de frenado debe añadirse a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad que la solución del sustrato.
12. Leer a 450 nm, y utilizar 620 nm como longitud de onda de referencia en los 30 min. siguientes a haber parado la reacción. Los valores de absorbancia serán utilizados para el cálculo de resulta- dos.

h. Criterios de validación del ensayo

Los resultados obtenidos por los controles deben ser analizados antes de interpretar los resultados de las muestras. Determinar la media de absorbancias de los controles positivo y negativo.
El ensayo se considerará válido cuando:

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

- El valor medio de DO corregida del control positivo (CP) sea mayor o igual que 0,500 ODCP≥0,500
- La relación del valor medio de DO corregida del control positivo (CP) respecto al valor corregido del negativo (CN) debe ser mayor o igual que 5 ODCP/ODCN≥ 5

Deberán cumplirse ambos criterios para que el ensayo sea válido. Si no, el ensayo deberá repetirse.

I. Cálculo de resultado de la muestra

% Positividad (PP) de la muestra = (DO muestra-DOCN) /DOCP-DOCN) *100
DOCP= media de los valores del Control Positivo
DOCN = media de los valores del Control Negativo
El porcentaje de positividad (%P, PP) del Control positivo se considera el 100%.

J. Interpretación de resultados

• Una muestra bovina u ovina es POSITIVA si su valor de Porcentaje de Positividad es SUPERIOR o IGUAL al valor del Cutt off de 15% Porcentaje de Positividad (%P). Para muestras de leche, bovina se considerarán positivas si el %P es mayor o igual del 10%. Un resultado positivo indica que el animal puede estar infectado con M. paratuberculosis y que existen animales potencialmente infectados en el rebaño.

• Una muestra bovina u ovina es NEGATIVA si su valor de Porcentaje de Positividad es MENOR que el valor del cut off de 15% Porcentaje de Positividad (%P). Para muestras de leche bovina, se considerarán negativas si su valor de %P es menor del 10%. Un resultado negativo de un único animal sólo puede interpretarse cuando se conocen el histórico y los resultados de todo el rebaño. Aunque, generalmente los animales se infectan al nacer, puede que la respuesta inmunológica no se produzca inmediatamente. La información disponible sugiere que la seroconversión se produce antes de la aparición de signos clínicos. Como todas las pruebas biológicas, este ensayo puede ocasionalmente dar falsos positivos o falsos negativos debido a condiciones locales. Un ensayo debe interpretarse en el contexto de todos los datos clínicos disponibles, un histórico y una información epidemiológica relevantes para los animales de la prueba. En algunos casos, se precisarán nuevas pruebas de confirmación.
La responsabilidad para la interpretación de los resultados y las consiguientes decisiones con respecto a la explotación estudiada reside únicamente en el utilizador, en los controles veterinarios y en los asesores de las autoridades competentes. PRIONICS AG no acepta ninguna responsabilidad sobre cualquier pérdida o daño derivado de la interpretación de los resultados.

K. Información técnica

Seguir las instrucciones de PARACHEK® 2 Johne's Absorbed EIA rigurosamente ya que cualquier variación en el protocolo puede afectar al funcionamiento del test y dar resultados erróneos.

1. Mezclar el conjugado y el diluyente azul en el vortex. Los resultados se pueden afectar si se hace demasiado fuerte. El vortex deberá utilizarse a velocidad moderada, empezando y parando 3-4 veces para evitar o minimizar la formación de espuma del diluyente. Esta precaución debería tomarse siempre que se mezclen reactivos biológicos. No obstante, la mezcla insuficiente puede dar también problemas. Recordar que la mezcla no sufrirá daños siempre y cuando se agite suavemente. Para que el ensayo sea repetitivo y exacto, asegurarse de que el conjugado está perfectamente mezclado.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

2. Las instrucciones del kit indican que la placa debe agitarse después de añadir los reactivos. El hecho de no agitar podría afectar a la reproducibilidad de ensayo y dar resultados inválidos. Después de añadir cada reactivo, la placa debe agitarse en un agitador de placas durante 1 min. También deberá agitarse de la misma forma antes de leer la absorbancia.

3. Hacer un blanco en los lectores de EIA puede ser problemático ya que cada lector realiza esta operación de forma diferente respecto al control negativo. Hacer el blanco con una placa vacía y limpia.

L. Notas Generales

Nota informativa: Este manual se considera completo y correcto en el momento de su publicación. Prionics AG no asume ninguna responsabilidad por daños fortuitos o consiguientes en relación con o tras el uso de este manual.

Responsabilidad: Prionics AG garantiza que sus productos cumplen las correspondientes especificaciones publicadas, siempre que se usen de acuerdo con las instrucciones correspondientes que sean del caso y dentro de la fecha de caducidad de los productos. Prionics AG no da ninguna otra garantía, explícita o implícita. No hay ninguna garantía de comercialidad o idoneidad para un uso particular. La garantía aquí ofrecida y los datos, especificaciones y descripciones de los productos Prionics AG que aparecen en catálogos de Prionics AG impresos y en la bibliografía sobre los productos no pueden ser modificados salvo tras acuerdo escrito explícito firmado por un representante autorizado de Prionics AG. Cualquier representación oral o escrita en contradicción con esta garantía o con dichas publicaciones no está autorizada y, si ha sido dada no es de fiar. En caso de incumplimiento de la garantía susodicha, la única obligación de Prionics AG consistirá, a su elección, en reparar o remplazar el producto en cuestión o parte del mismo, siempre que el cliente notifique el incumplimiento a Prionics AG sin demora. Si, tras esfuerzos razonables, Prionics AG resulta incapaz de reparar o restituir el producto o parte del mismo, entonces Prionics AG restituirá al cliente todos los efectivos pagados por el producto o la parte en cuestión. Prionics AG no asume ninguna responsabilidad por daños indirectos fortuitos, consiguientes, especiales o de cualquier otro tipo que resulten de pérdidas económicas o daños a la propiedad sufridos por cualquier cliente como consecuencia del uso de sus productos.

8. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha de Revisión	Versión	Descripción del cambio	Responsable
Julio 23 de 2022	001	Se actualizan los recursos e insumos que se requieren para la prueba (6.2). Se actualiza el párrafo de Material de Referencia. Se actualiza la descripción de IBR (7.4.2). Se eliminan las columnas de 2 placas en (7.1.2), (7.3.2. c), (7.4.2.c). En el numeral 7.2.1 c se eliminan las columnas de 2 y de 10 placas. En todo el procedimiento se elimina como muestra la leche, ya que solo se realiza en suero.	Jeanethe Rojas R. Gerente de Calidad.

La presente información es propiedad del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Zoolab.
Es CONFIDENCIAL y para el uso interno. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.
La versión vigente del documento se encuentra publicada en el DRIVE de la compañía, por lo tanto, todo documento impreso es considerado copia no controlada; es responsabilidad de quien imprime el documento verificar en el sistema que corresponda a la última versión

ARL

La República de Colombia, el Ministerio de Trabajo y ARL SURA

CERTIFICA QUE

LUISA FERNANDA CORTES AVELLANEDA

C52352902

HA FINALIZADO CORRECTAMENTE LA FORMACIÓN

ACTUALIZACIÓN VIRTUAL SGSST (20 HORAS)

HORAS CERTIFICADAS

20

En testimonio de lo anterior, se firma el presente el
26 de abril de 2021
Registro Certificado de Oferente de Seguros de Riesgos Laborales Suramericana S.A. RCO-0003.

YIzoc6cqQx

DIRECCIÓN DE CALIDAD DE SERVICIOS DE SALUD
SUBDIRECCIÓN INSPECCIÓN, VIGILANCIA Y CONTROL DE SERVICIOS DE SALUD

RESOLUCIÓN No. 7603 de 01/03/2021

"Por la cual se Concede Licencia de Prestación de Servicios en Seguridad y Salud en el Trabajo"

LA SUBDIRECTORA DE INSPECCIÓN, VIGILANCIA Y CONTROL DE SERVICIOS DE SALUD.

En uso de sus facultades legales conferidas en los artículos 23 de la ley 1562 de 2012 y 1o. de la Resolución 4502 del 28 de diciembre de 2012 del Ministerio de Salud y Protección Social y en especial por las que le confiere el Decreto 507 del 6 de noviembre de 2013 de la Alcaldía Mayor de Bogotá y,

CONSIDERANDO:

Que el (la) señor(a) LUISA FERNANDA CORTES AVELLANEDA, identificado(a) con CC 52352902, ha solicitado Licencia para prestación de servicios en Seguridad y Salud en el Trabajo como persona natural.

Que el peticionario ha presentado la documentación necesaria, exigida por el literal A del Artículo Segundo de la Resolución 4502 del 28 de diciembre de 2012 del Ministerio de Salud y Protección Social.

Que revisada la solicitud presentada con su documentación anexa y verificado el cumplimiento de los requisitos exigidos por la Resolución No. 4502 de 2012 expedida por el Ministerio de Salud y Protección Social para el otorgamiento de la licencia de salud ocupacional, se considera procedente la expedición de licencia solicitada.

En mérito de lo expuesto, la Subdirectora de inspección, vigilancia y control de servicios de salud de la Secretaría Distrital de Salud

RESUELVE:

ARTICULO PRIMERO: Conceder Licencia de Prestación de Servicios en Seguridad y Salud en el Trabajo a LUISA FERNANDA CORTES AVELLANEDA, Identificado(a) con CC 52352902, como PSICÓLOGO ESPECIALISTA EN GERENCIA EN SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO .

ARTICULO SEGUNDO: La licencia otorgada comprende la prestación de servicios en Seguridad y Salud en el Trabajo en las siguientes áreas o campos de acción:

- Investigación en área técnica
- Investigación del accidente de trabajo
- Educación
- Capacitación
- Diseño, Administración y Ejecución del sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo
- Psicología en Seguridad y Salud en el Trabajo

ARTÍCULO TERCERO: La presente Licencia se concede por término de diez (10) años, es de carácter personal e intransferible, tendrá validez en todo el territorio nacional y puede solicitarse su renovación, por un término igual, en cualquier Secretaría Seccional o Distrital del país.

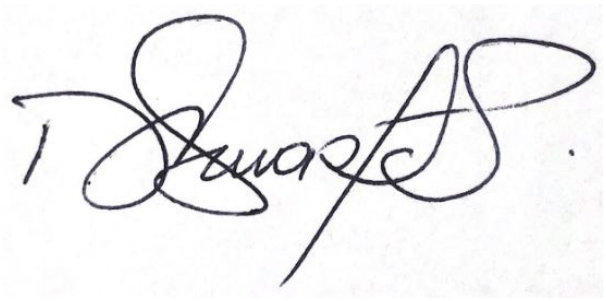
ARTICULO CUARTO: Cuando el titular de la licencia modifique alguna de las condiciones acreditadas en el momento de su obtención, deberá informar tal hecho a la Dirección de Calidad de Servicios de Salud - Subdirección Inspección, Vigilancia y Control de Servicios de Salud de esta Secretaría de Salud, a fin de que se proceda a modificar la resolución por la cual se otorgó la licencia. En caso contrario incurrirá en las sanciones previstas en las normas legales vigentes.

ARTICULO QUINTO: El titular de la licencia deberá dar estricto cumplimiento a las normas que regulan la materia, en especial a la Ley 1562 de 2012, Resolución 4502 del 28 de diciembre de 2012 y demás normas que la modifiquen o adicionen.

ARTICULO SEXTO: Notificar esta Resolución a LUISA FERNANDA CORTES AVELLANEDA informándole que de conformidad con el artículo 74 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo (Ley 1437 de 2011) contra la misma proceden los recursos de reposición y en subsidio apelación, los cuales podrá interponer ante esta Secretaría, dentro de los diez (10) días hábiles siguientes a la notificación de este acto administrativo.

NOTIFIQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá, D.C. a los 01/03/2021



DORA DUARTE PRADA

Subdirectora Inspección, Vigilancia y Control de Servicios de Salud

Código de verificación: n2Z9usMQe8

Elaboró: olinfante

Revisó: cevillanueva

Aprobó: dduarte

Ministerio del Trabajo

Número Radicado: **REME-SGSST - 501270 - 2023 - 1**

Nombre de la Empresa :	ZOOLAB S.A.S.		
Tipo Persona	Jurídica	Regimén Tributario :	Régimen común
Tipo Documento Empresa :	Número de Identificación Tributario	Número de Documento	830085197
Nombre Representante Legal :	Sandra Liliana Cortes Avellaneda		
Responsable SG-SST :	LUISA FERNANDA CORTES AVELLANEDA	Correo SG-SST :	gerencia@kenzasas.com
Periodo Correspondiente :	2023	Número Teléfonico fijo :	6017044879
Correo Electrónico :	gerencia@zoolabcolombia.com	Cantidad Trabajadores :	8

Código CIIU	Riesgo	Actividad Económica
2750001	**Riesgo II**	**ACTIVIDADES VETERINARIAS, INCLUYE LAS ACTIVIDADES DE ATENCIÓN MÉDICA Y CONTROL DE ANIMALES EN ESTABLECIMIENTOS AGROPECUARIOS Y CONTROL DE ANIMALES DOMÉSTICOS, ASISTENTES VETERINARIOS U OTRO PERSONAL AUXILIAR VETERINARIO, DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO- PATOLÓGICO Y OTROS DIAGNÓSTICOS RELACIONADOS CON ANIMALES, VETERINARIAS QUEREQUIERAN LA UTILIZACIÓN DE AMBULANCIA PARA ANIMALES.**

ESTÁNDARES MÍNIMOS SGSST
TABLA DE VALORES Y CALIFICACIÓN

CICLO	ESTÁNDAR	ESTÁNDAR	ITEM	VALOR ESTÁNDAR	PUNTAJE	CALIFICACION
Planear	1. Recursos	1.1. Recursos financieros, técnicos humanos y de otra índole requeridos para coordinar y desarrollar el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.1.1 Responsable del Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo SG - SST	0.50	Cumple totalmente	0.50
Planear	1. Recursos	1.1. Recursos financieros, técnicos humanos y de otra índole requeridos para coordinar y desarrollar el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.1.2 Responsabilidades en el Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo SG - SST	0.50	No aplica	0.50

CICLO	ESTÁNDAR	ESTÁNDAR	ITEM	VALOR ESTÁNDAR	PUNTAJE	CALIFICACION
Planear	1. Recursos	1.1. Recursos financieros, técnicos humanos y de otra índole requeridos para coordinar y desarrollar el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.1.3 Asignación de recursos para el Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo SG - SST	0.50	No aplica	0.50
Planear	1. Recursos	1.1. Recursos financieros, técnicos humanos y de otra índole requeridos para coordinar y desarrollar el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.1.4 Afiliación al Sistema General de Riesgos Laborales	0.50	Cumple totalmente	0.50
Planear	1. Recursos	1.1. Recursos financieros, técnicos humanos y de otra índole requeridos para coordinar y desarrollar el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.1.5 Identificación de trabajadores de alto riesgo y cotización de pensión especial	0.50	No aplica	0.50
Planear	1. Recursos	1.1. Recursos financieros, técnicos humanos y de otra índole requeridos para coordinar y desarrollar el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.1.6 Conformación COPASST	0.50	No aplica	0.50
Planear	1. Recursos	1.1. Recursos financieros, técnicos humanos y de otra índole requeridos para coordinar y desarrollar el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.1.7 Capacitación COPASST	0.50	No aplica	0.50

CICLO	ESTÁNDAR	ESTÁNDAR	ITEM	VALOR ESTÁNDAR	PUNTAJE	CALIFICACION
Planear	1. Recursos	1.1. Recursos financieros, técnicos humanos y de otra índole requeridos para coordinar y desarrollar el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.1.8 Conformación Comité Convivencia	0.50	No aplica	0.50
Planear	1. Recursos	1.2. Capacitación en el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.2.1 Programa Capacitación Promoción y Prevención P y P	2.00	Cumple totalmente	2.00
Planear	1. Recursos	1.2. Capacitación en el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.2.2 Inducción y reinducción en Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo SG - SST Actividades de Promoción y Prevención P y P	2.00	No aplica	2.00
Planear	1. Recursos	1.2. Capacitación en el Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo	1.2.3 Responsables del Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo SG - SST con curso virtual de 50 horas	2.00	No aplica	2.00
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.1. Política de Seguridad y Salud en el Trabajo	2.1.1 Política del Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo SG - SST firmada, fecha y comunicada al COPASST	1.00	No aplica	1.00
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.2. Objetivos del Sistema de Gestión de la Seguridad y Salud en el Trabajo SG-SST	2.2.1 Objetivos definidos, claros, medibles, cuantificables, con metas, documentados, revisados del SG - SST	1.00	No aplica	1.00
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.3. Evaluación inicial del SG-SST	2.3.1 Evaluación e identificación de prioridades	1.00	No aplica	1.00
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.4. Plan anual de trabajo	2.4.1 Plan que identifica objetivos, metas, responsabilidad, recursos con cronograma y firmado	2.00	Cumple totalmente	2.00

CICLO	ESTÁNDAR	ESTÁNDAR	ITEM	VALOR ESTÁNDAR	PUNTAJE	CALIFICACION
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.5. Conservación de la documentación	2.5.1 Archivo o retención documental del Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo SG-SST	2.00	No aplica	2.00
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.6. Rendición de cuentas	2.6.1 Rendición sobre el desempeño	1.00	No aplica	1.00
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.7. Normatividad nacional vigente y aplicable en materia de seguridad y salud en el trabajo	2.7.1 Matriz legal	2.00	No aplica	2.00
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.8. Comunicación	2.8.1 Mecanismos de comunicación, auto reporte en Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo SG-SST	1.00	No aplica	1.00
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.9. Adquisiciones	2.9.1 Identificación, evaluación, para adquisición de productos y servicios en Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo SG-SST	1.00	No aplica	1.00
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.10. Contratación	2.10.1 Evaluación y selección de proveedores y contratistas	2.00	No aplica	2.00
Planear	2. Gestión integral del sistema de gestión de la seguridad y salud en el trabajo	2.11. Gestión del cambio	2.11.1 Evaluación del impacto de cambios internos y externos en el Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo SG-SST	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.1. Condiciones de salud en el trabajo	3.1.1 Descripción sociodemográfica – Diagnóstico de condiciones de salud	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.1. Condiciones de salud en el trabajo	3.1.2 Actividades de Promoción y Prevención en Salud	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.1. Condiciones de salud en el trabajo	3.1.3 Información al médico de los perfiles de cargo	1.00	No aplica	1.00

CICLO	ESTÁNDAR	ESTÁNDAR	ITEM	VALOR ESTÁNDAR	PUNTAJE	CALIFICACION
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.1. Condiciones de salud en el trabajo	3.1.4 Realización de Evaluaciones Médicas Ocupacionales -Peligros- Periodicidad- Comunicación al Trabajador	1.00	Cumple totalmente	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.1. Condiciones de salud en el trabajo	3.1.5 Custodia de Historias Clínicas	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.1. Condiciones de salud en el trabajo	3.1.6 Restricciones y recomendaciones médico/laborales	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.1. Condiciones de salud en el trabajo	3.1.7 Estilos de vida y entornos saludables (controles tabaquismo, alcoholismo, farmacodependencia y otros)	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.1. Condiciones de salud en el trabajo	3.1.8 Agua potable, servicios sanitarios y disposición de basuras	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.1. Condiciones de salud en el trabajo	3.1.9 Eliminación adecuada de residuos sólidos, líquidos o gaseosos	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.2. Registro, reporte e investigación de las enfermedades laborales, los incidentes y accidentes de trabajo	3.2.1 Reporte de los Accidentes de Trabajo y Enfermedad Laboral a la ARL, EPS y Dirección Territorial del Ministerio de Trabajo	2.00	No aplica	2.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.2. Registro, reporte e investigación de las enfermedades laborales, los incidentes y accidentes de trabajo	3.2.2 Investigación de incidentes, accidentes y enfermedades laborales	2.00	No aplica	2.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.2. Registro, reporte e investigación de las enfermedades laborales, los incidentes y accidentes de trabajo	3.2.3 Registro y análisis estadístico de accidentes y enfermedades laborales	1.00	No aplica	1.00

CICLO	ESTÁNDAR	ESTÁNDAR	ITEM	VALOR ESTÁNDAR	PUNTAJE	CALIFICACION
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.3. Mecanismos de vigilancia de las condiciones de salud de los trabajadores	3.3.1 Medición de la frecuencia de la accidentalidad	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.3. Mecanismos de vigilancia de las condiciones de salud de los trabajadores	3.3.2 Medición de la severidad de la accidentalidad	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.3. Mecanismos de vigilancia de las condiciones de salud de los trabajadores	3.3.3 Medición de la mortalidad por Accidentes de Trabajo	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.3. Mecanismos de vigilancia de las condiciones de salud de los trabajadores	3.3.4 Medición de la prevalencia de Enfermedad Laboral	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.3. Mecanismos de vigilancia de las condiciones de salud de los trabajadores	3.3.5 Medición de la incidencia de Enfermedad Laboral	1.00	No aplica	1.00
Hacer	3. Gestión de la Salud	3.3. Mecanismos de vigilancia de las condiciones de salud de los trabajadores	3.3.6 Medición del ausentismo por causa médica	1.00	No aplica	1.00
Hacer	4. Gestión de peligros y riesgos	4.1. Identificación de peligros, evaluación y valoración de los riesgos	4.1.1 Metodología para la identificación de peligros, evaluación y valoración de los riesgos	4.00	Cumple totalmente	4.00
Hacer	4. Gestión de peligros y riesgos	4.1. Identificación de peligros, evaluación y valoración de los riesgos	4.1.2 Identificación de peligros con participación de todos los niveles de la empresa	4.00	No aplica	4.00
Hacer	4. Gestión de peligros y riesgos	4.1. Identificación de peligros, evaluación y valoración de los riesgos	4.1.3 Identificación de sustancias catalogadas como carcinógenas o con toxicidad aguda	3.00	No aplica	3.00
Hacer	4. Gestión de peligros y riesgos	4.1. Identificación de peligros, evaluación y valoración de los riesgos	4.1.4 Realización mediciones ambientales, químicos, físicos y biológicos	4.00	No aplica	4.00

CICLO	ESTÁNDAR	ESTÁNDAR	ITEM	VALOR ESTÁNDAR	PUNTAJE	CALIFICACION
Hacer	4. Gestión de peligros y riesgos	4.2. Medidas de prevención y control para intervenir los peligros / riesgos	4.2.1 Implementación de medidas de prevención y control de peligros/riesgos identificados	2.50	Cumple totalmente	2.50
Hacer	4. Gestión de peligros y riesgos	4.2. Medidas de prevención y control para intervenir los peligros / riesgos	4.2.2 Verificación de aplicación de medidas de prevención y control por parte de los trabajadores	2.50	No aplica	2.50
Hacer	4. Gestión de peligros y riesgos	4.2. Medidas de prevención y control para intervenir los peligros / riesgos	4.2.3 Elaboración de procedimientos, instructivos, fichas, protocolos	2.50	No aplica	2.50
Hacer	4. Gestión de peligros y riesgos	4.2. Medidas de prevención y control para intervenir los peligros / riesgos	4.2.4 Realización de inspecciones a las instalaciones, maquinaria o equipos con la participación del COPASST	2.50	No aplica	2.50
Hacer	4. Gestión de peligros y riesgos	4.2. Medidas de prevención y control para intervenir los peligros / riesgos	4.2.5 Mantenimiento periódico de instalaciones, equipos, máquinas, herramientas	2.50	No aplica	2.50
Hacer	4. Gestión de peligros y riesgos	4.2. Medidas de prevención y control para intervenir los peligros / riesgos	4.2.6 Entrega de Elementos de Protección Personal EPP, se verifica con contratistas y subcontratistas	2.50	No aplica	2.50
Hacer	5. Gestión de amenazas	5.1. Plan de prevención, preparación y respuesta ante emergencias	5.1.1 Se cuenta con el Plan de Prevención, Preparación y Respuesta ante emergencias	5.00	No aplica	5.00
Hacer	5. Gestión de amenazas	5.1. Plan de prevención, preparación y respuesta ante emergencias	5.1.2 Brigada de prevención conformada, capacitada y dotada	5.00	No aplica	5.00
Verificar	6. Verificación del SG - SST	6.1. Gestión y resultados del SG - SST	6.1.1 Definición de indicadores del SG-SST de acuerdo condiciones de la empresa	1.25	No aplica	1.25

CICLO	ESTÁNDAR	ESTÁNDAR	ITEM	VALOR ESTÁNDAR	PUNTAJE	CALIFICACION
Verificar	6. Verificación del SG - SST	6.1. Gestión y resultados del SG - SST	6.1.2 La empresa adelanta auditoría por lo menos una vez al año	1.25	No aplica	1.25
Verificar	6. Verificación del SG - SST	6.1. Gestión y resultados del SG - SST	6.1.3 Revisión anual por la alta dirección, resultados y alcance de la auditoría	1.25	No aplica	1.25
Verificar	6. Verificación del SG - SST	6.1. Gestión y resultados del SG - SST	6.1.4 Planificación auditorías con el COPASST	1.25	No aplica	1.25
Actuar	7. Mejoramiento	7.1. Acciones preventivas y correctivas con base en los resultados del SG - SST	7.1.1 Definición de acciones preventivas y correctivas con base en resultados del SG-SST	2.50	No aplica	2.50
Actuar	7. Mejoramiento	7.1. Acciones preventivas y correctivas con base en los resultados del SG - SST	7.1.2 Acciones de mejora conforme a revisión de la alta dirección	2.50	No aplica	2.50
Actuar	7. Mejoramiento	7.1. Acciones preventivas y correctivas con base en los resultados del SG - SST	7.1.3 Acciones de mejora con base en investigaciones de accidentes de trabajo y enfermedades laborales	2.50	No aplica	2.50
Actuar	7. Mejoramiento	7.1. Acciones preventivas y correctivas con base en los resultados del SG - SST	7.1.4 Elaboración Plan de Mejoramiento e implementación de medidas y acciones correctivas solicitadas por autoridades y ARL	2.50	No aplica	2.50
Total, Valor Estándar Valores Míminos de Calificación						100.00

Cuando se cumple con el ítem del estándar la calificación será la máxima del respectivo ítem, de lo contrario su calificación será igual a cero (0).

En los ítems de la Tabla de Valores que no aplican para las empresas de menos de cincuenta (50) trabajadores clasificados con riesgo I, II, o III, de conformidad con los Estándares Mínimos de SST vigentes, se deberá otorgar el porcentaje máximo de calificación en la columna “No Aplica” frente al ítem correspondiente.

El presente formulario es documento público. La información aquí consignada debe ser veraz. La inclusión de manifestaciones falsas estará sujeta a las sanciones contempladas en la Ley 599 de 2000, Código Penal Colombiano (artículos 287, 288, 291, 294).

Fecha y hora de generación del Reporte 2/28/2024 10:17 AM
Fecha de Diligenciamiento : 2/28/2024

PROCESO DE GESTIÓN CONTRACTUAL

ETAPA PRECONTRACTUAL

CERTIFICADO DE IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA DE GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO

Bogota, Octubre 24 de 2024
Señores
SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE SENA
Mosquera (Cundinamarca).

Ref.: Proceso No. **MC-CMC-CBA-0019-2024**

SANDRA LILIANA CORTES AVELLANEDA, actuando en calidad de representante legal, de ZOOLAB SAS, certifico que se encuentra implementado el SISTEMA DE GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO -SG-SST según los estándares mínimos señalados la normatividad vigente al respecto y contamos con el personal idóneo para su implementación, mantenimiento y divulgación correspondiente.

De igual manera, respecto de nuestro personal, daremos cumplimiento en su totalidad a los requisitos legales en Seguridad y Salud en el Trabajo y Medio Ambiente de conformidad con lo dispuesto en el Decreto 1072 de 2015, con el fin de garantizar la mitigación y control de los aspectos e impactos ambientales y de seguridad y salud en el trabajo, que puedan generarse en el desarrollo de las actividades contractuales y posteriores a estas.

Atentamente,



Firma Representante Legal

Nombre: SANDRA LILIANA CORTES AVELLANEDA

Cargo: GERENTE GENERAL

Documento de Identidad: 52.265.505

Correo Electrónico: gerencia@zoolabcolombia.com

CURSO 20 HORAS

Decreto 1072 de 2015
Circular 063 de 2022

REGISTRO: RCO-026

MINISTERIO DEL TRABAJO

Escuela unipymes

Fundación Unipymes

Hace constar que:

LUISA FERNANDA CORTES AVELLANEDA

Número de Documento: 52352902

Cursó y aprobó en la capacitación de Curso 20 Horas - Avalado Mintrabajo

Fecha de Certificación: 2024-11-04

Intensidad Horaria: 20 horas

RCO-026 (Oferente MinTrabajo)

María Mercedes López - Directora

SEGUROS DE VIDA SURAMERICANA S.A. – ARL SURA

Informa que la empresa ZOOLAB S. A. S. con Nit 830085197 , se encuentra afiliada a ARL SURA.

En cumplimiento de la normatividad vigente, actualmente se encuentra implementando el Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo (SG-SST) y para ello, ZOOLAB S. A. S. aplicó la herramienta diagnóstica de la Resolución 0312 de 2019 el 23/10/2024 cuyo resultado se presenta en este informe.

La autoevaluación de los Estándares Mínimos es realizada por el empleador según el artículo 28 de la Resolución 0312 de 2019, y los datos ingresados obedecen única y exclusivamente a su criterio como empresa. ARL SURA no suministra o diligencia información, ni es responsable de los resultados que de ella se generen.

El resultado obtenido es:

Item evaluado	% Calificación Real	Valor Ponderado (%)	% Implementación
Planear (25%)	100	25	25
Hacer (60%)	98.33	60	59
Verificar (5%)	100	5	5
Actuar (10%)	100	10	10
% Total implementación			**99.0**

De acuerdo a su porcentaje de implementación del 99.0 su resultado es ACEPTABLE.

La empresa es responsable en el desarrollo de las actividades para dar cumplimiento a los requisitos normativos legales vigentes, al monitoreo, disminución y control de los riesgos como también a la implementación total del Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo, garantizando el bienestar de sus trabajadores.

La presente comunicación se expide a solicitud de la empresa el 23/10/2024.

Atentamente



Gerencia Técnica Arl Sura
Código transacción: 5100104

VIGILADO SUPERINTENDENCIA FINANCIERA DE COLOMBIA

CONTRATO ÚNICO DE PRESTACIÓN DE SERVICIO
DE RECOLECCIÓN, ALMACENAMIENTO, DISPOSICIÓN FINAL, TRANSPORTE Y TRATAMIENTO DE RESIDUOS PELIGROSOS

Se adopta el contrato único para la prestación del servicio entre el USUARIO SUSCRIPTOR y ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. ESP----------

No. CÓDIGO ECO	8538	FECHA FIRMA CONTRATO	DD	2022-02-28	AA	
No. CONTRATO	8009512	FECHA INICIACIÓN	DD	2022-02-28	AA	
NIT REGISTRADO ACTUAL	8300851978	TIENE VARIAS SEDES - PUNTOS	SI		NO	X

DATOS DE USUARIO O SUSCRIPTOR

USUARIO O SUSCRIPTOR	PAULA LUQUE ISAZA	C.C.	C.E.	1032459644
CONTRATANTE	SANDRA CORTES AVELLANEDA	C.C.	C.E.	52265505

DATOS DEL ESTABLECIMIENTO PARA PRESTACIÓN DE SERVICIO

RAZÓN SOCIAL	ZOOLAB E U	NIT VERIFICADO NUEVO	830085197	DV	8
NOMBRE COMERCIAL	ZOOLAB SAS	TELÉFONO FIJO	7044879		
DIRECCIÓN ADMINISTRATIVA	KR 73 53 04	CELULAR 1	3138711855		
DIRECCIÓN DE RECOLECCION	KR 73 53 04	CELULAR 2	3133776385		
BARRIO RECOLECCIÓN	NORMANDIA	EMAIL NOTIFICACIÓN NOVEDADES SERVICIO	gertecnica@zoolabcolombia.com		
LOCALIDAD RECOLECCIÓN	ENGATIVÁ	EMAIL FACTURA ELECTRÓNICA	auxcontable@zoolabcolombia.com		
HORARIO ATENCIÓN	lunes a viernes de 8 a 5	CATEGORÍA PRODUCTOR	Mediano Productor	Pequeño Productor X	Micro productor
CONTACTO OPERATIVO	DANILO ARELLANA	TELÉFONO CELULAR	3133776385		
CARGO	Auxiliar contable	EMAIL NOTIFICACIÓN	XCONTABLE@ZOOLABCOLOMBIA.CO		

PRECIO

- **Precio básico por frecuencia: $39.900** (incluye: transporte, recolección, almacenamiento y disposición final).

MUNICIPIO	VALOR	MUNICIPIO	VALOR
Bogotá	$ 39.900	Madrid	$ 44.580
Cajica	$ 44.450	Mosquera	$ 43.540
Calera	$ 41.850	Puente de Pi	$ 43.150
Calera - Pueblo	$ 43.800	Siberia	$ 42.500
Calera - Salitre	$ 45.100	Soacha	$ 39.900

HORARIO DE RECOLECCIÓN

El horario para realizar la recolección de los residuos está comprendido entre las 7:00 a.m. y 5:00 p.m. de lunes a viernes y sábados de 7:00 a.m. a 2:00 p.m.

VIGENCIA

Este contrato tendrá vigencia de doce (12) meses, contados a partir del día/mes/año. El presente contrato se renueva sucesiva y automáticamente por un plazo igual a la inicial, salvo que de aviso de no renovación con tres (3) meses de anticipación al vencimiento del plazo inicial o sus prórrogas.

Chía	$ 44.450	Subachoque	$ 45.100
Cota	$ 43.020	Tenjo	$ 43.800
El Rosal	$ 43.800	Ubate	$ 50.820
Facatativa	$ 47.700	Usme	$ 41.850
Funza	$ 42.760	Zipaquira	$ 46.400

- **Tarifa por Tratamiento:** Su cobro se efectúa con base a los kilos de desechos o residuos que entregue el usuario/suscriptor:
  Costo Tratamiento por Kg **$1.400**

PERMANENCIA MÍNIMA
"Anexo 1"

ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. E.S.P. (en lo adelante **ECOCAPITAL**), es una empresa debidamente habilitada para hacer actos de comercio conforme a la normatividad colombiana, identificada con NIT 830.133.755-4, representada por **JUAN CARLOS VILLAVECES PARDO**, con cédula de ciudadanía No. 80.414.069 de Bogotá, mayor de edad, quien tiene plenas facultades legales para la firma e este contrato como consta en certificación de Cámara de Comercio de Bogotá, por una parte y por la otra el USUARIO/SUSCRIPTOR que se identifica en la primera de este documento, que bajo su persona o representante legal, es una persona con capacidad para adquirir derechos y obligaciones conforme a la normatividad colombiana, que cuenta con las facultades necesarias para suscribir el presente contrato y que es su voluntad contratar los servicios proporcionados por **ECOCAPITAL** de acuerdo a lo establecido en este Contrato. El presente contrato se regirá por las siguientes cláusulas: ----------

PRIMERA. OBJETO: ECOCAPITAL se obliga para con el usuario/suscriptor a prestar con sus propios medios y bajo su única responsabilidad, el servicio de recolección, transporte, almacenamiento, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos (RESPEL) y similares, en la dirección indicada en este Contrato, identificada en la parte de arriba.

SEGUNDA. DEFINICIONES: A efectos de la interpretación y ejecución del presente contrato se efectúan las siguientes definiciones: ----------

a) Usuario/suscriptor: persona natural y jurídica que se defina como mediano, pequeño y micro generador o poseedor de residuos o desechos peligrosos conforme a la normativa ambiental colombiana, se encuentre en el registro de generador y tenga la obligación de adquirir el servicio de recolección, disposición y tratamiento de estos residuos;
b) Recolección: Acción y efecto de recoger y retirar los residuos o desechos de uno o varios generadores de residuos hospitalarios y su ubicación en los vehículos de transporte;
c) Transporte: sistema de transporte que incluye: un medio físico, vías, instalaciones para terminales, vehículos automotor y operaciones para el traslado de residuos;
d) Almacenamiento: Acción del prestador del servicio consistente en depositar transitoriamente en forma segregada y en instalaciones de la base de operaciones los residuos susceptibles de tratamiento por las vías de desactivación-trituración y termodestrucción;
e) Tratamiento: Conjunto de operaciones, procesos o técnicas que modifican las características de los residuos, incrementando sus posibilidades de reutilización o para minimizar los impactos ambientales y riesgos a la salud humana;
f) Disposición Final: Consiste en el proceso de aislar y confinar los residuos en forma definitiva, en lugares especialmente seleccionados, diseñados y operados técnica y ambientalmente para evitar la contaminación y los daños o riesgos a la salud y al ambiente.

g) Residuos peligrosos: Es aquel residuo o desecho que, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables, infecciosas o radiactivas, puede causar riesgos, daños o efectos no deseados, directos e indirectos, a la salud humana y el ambiente. Así mismo, se considerará residuo peligroso los empaques, envases y embalajes que estuvieron en contacto con ellos.
h) Residuos biosanitarios: Elementos o instrumentos utilizados durante la ejecución de los procedimientos asistenciales que tienen contacto con materia orgánica, sangre o fluidos corporales del paciente humano o animal.
i) Residuos Anatomopatológicos: Son los provenientes de restos humanos, muestras para análisis, incluyendo biopsias, tejidos orgánicos amputados, partes y fluidos corporales, que se remueven durante necropsias, cirugías u otros procedimientos, tales como placentas, restos de exhumaciones, sangre entre otros.
j) Residuos Cortopunzantes: Aquellos que por sus características punzantes o cortantes pueden dar origen a un accidente percutáneo infeccioso.
k) Residuos Animales: Son aquellos residuos provenientes de animales de experimentación, inoculados con microorganismos patógenos o de animales portadores de enfermedades infectocontagiosas.
l) Residuos o desechos radiactivos: Se entiende por residuo o desecho radiactivo aquellos que contienen radionucleidos en concentraciones o con actividades mayores que los niveles de dispensa establecidos por la autoridad reguladora o que están contaminados con ellos.
m) Otros residuos o desechos peligrosos: Los demás residuos de carácter peligroso que presenten características de corrosividad, explosividad, reactividad, toxicidad e inflamabilidad generados en la atención en salud y en otras actividades, de acuerdo con lo establecido en la normatividad vigente y su clasificación.
o) (RAEE) Residuos de Aparatos Eléctricos y Electrónicos los aparatos eléctricos y electrónicos o sus componentes, consumibles y subconjuntos, a partir del momento en que pasan a ser residuos.
p) RH1: Formulario que permitirá al generador establecer y actualizar los indicadores de gestión interna de forma cuantitativa, indicando el tipo y cantidad de residuos, en peso y unidades, que se entregan al prestador del servicio especial de aseo.

TERCERA. RESPONSABILIDAD DEL GENERADOR Y CATEGORÍAS: A los efectos del cumplimiento de la normativa ambiental colombiana, el usuario/suscriptor es el generador de los residuos o desechos peligrosos y es responsable en los términos de la normativa ambiental y sanitaria vigente sobre sus residuos peligrosos, así como de la información que suministra en el RH1 y cualquier otro formato, documento, registro que diligencie sobre el tipo desechos o residuos peligrosos que produce, su volumen y cantidad. Este tendrá las siguientes categorías de generador**:** 1) Mediano Productor: Usuario y/o suscriptor que genera una cantidad de residuos entre igual o superior a 750 y menor de 3.000 kilogramos; 2) Pequeño Productor: Usuario y/o suscriptor que genera una cantidad residuos igual o superior a 90 y menor a 750 kilogramos mes; 3) Microproductores: Usuario y/o suscriptor que genera una cantidad residuos menor a 90 kg mes.----------

CUARTA. PLAZO DE EJECUCIÓN Y PRÓRROGA AUTOMÁTICA: La vigencia del presente Contrato será el establecido en la primera parte del contrato que contiene las condiciones particulares al Servicio. El usuario/suscriptor acepta que el contrato se renueve automáticamente por un plazo igual a la inicial, salvo que dé aviso de no renovación con un (1) mes de anticipación al vencimiento del plazo inicial o su prórroga por escrito o medio electrónico. La cancelación del servicio por parte del usuario/suscriptor no lo exime del pago de las cantidades adeudadas a **ECOCAPITAL**. ----------

QUINTA. CLÁUSULA DE PERMANENCIA MÍNIMA: El usuario/suscriptor se obliga a no terminar anticipadamente la relación contractual que se ha estipulado y que se rige por las presentes Condiciones Particulares en la parte de arriba del contrato, para los servicios prestado por **ECOCAPITAL** durante 12 (doce) meses contados a partir de la firma de este

documento y el "Anexo 1". Esta cláusula se entiende eficaz con la firma del "Anexo 1" por parte del usuario/suscriptor. Una vez cumplido el término de la permanencia mínima, se entenderán prorrogadas las condiciones y términos originalmente pactados, es decir, la prórroga no incluye el precio especial del "Anexo 1" sino el precio ordinario del servicio. El usuario/suscriptor que celebra el contrato no estará sujeto a la permanencia mínima inicialmente convenida durante la vigencia de la prórroga por lo que tendrá derecho a terminar el contrato en cualquier momento sin que haya lugar al pago de sumas relacionadas con la terminación anticipada del contrato, salvo que durante el nuevo plazo de la prórroga el usuario/suscriptor que celebre el contrato pacte con **ECOCAPITAL** una nueva cláusula de permanencia mínima.----------

SEXTA. VALORES A PAGAR POR TERMINACIÓN ANTICIPADA: En el evento en que el usuario/suscriptor decida terminar en forma unilateral y anticipada el presente contrato dentro del plazo de permanencia mínima acordado con **ECOCAPITAL** en la cláusula de vigencia de la parte de arriba de las condiciones particulares o cuando la terminación se suceda por causas a él imputables, el usuario/suscriptor deberá pagar a **ECOCAPITAL** el monto que corresponda por terminación anticipada establecidos en el "Anexo 1". Igualmente, el usuario/suscriptor se obliga al pago del valor por terminación anticipada en los casos de suspensión imputables a él o cancelación (terminación del contrato) del servicio por falta de pago durante el período de permanencia mínima. ----------

SÉPTIMA. CONDICIONES DEL SERVICIO: El servicio que presta **ECOCAPITAL** se condiciona a los siguientes términos: 1) **ECOCAPITAL** garantizará el servicio prestado por todos los medios disponibles en el horario que informe **ECOCAPITAL**, que estará sujeto a cubrimiento del sector y logística operativa. Las frecuencias de recolección serán acordadas por registro histórico y/o acuerdo comercial entre las partes. Cualquier modificación por parte del usuario/suscriptor debe ser notificada de manera escrita con quince (15) días calendario de anticipación, en caso que por omisión, el prestador cumpla con el horario y día de recolección y no haya desechos o residuos, **ECOCAPITAL** efectuará el cobro del básico en la correspondiente factura y el manifiesto se presentará en cero; 2) En cuanto al manifiesto, ECOCAPITAL establece que una vez firmado por el usuario/suscriptor se concibe que el mismo corresponde al RH1 de cada generador. El usuario/suscriptor podrá expresar errores en el manifiesto y evidenciar su inconsistencia. La inconformidad seguirá el procedimiento establecido en los derechos del usuario/suscriptor y de verificarse un error por parte de **ECOCAPITAL** se levantará acta aclaratoria pero no se modificará el manifiesto; 3) En los casos en que el usuario/suscriptor no reporte el cambio de dirección, suspenda el servicio por razones imputables a él o cualquier condición o circunstancias por la cual el usuario/suscriptor no permita que se preste el servicio de recolección contratado, **ECOCAPITAL** podrá realizar la terminación anticipada con los efectos de la cláusula sexta del presente del contrato. Para los casos previamente mencionados, **ECOCAPITAL** efectuará el cobro del básico en la correspondiente factura y el manifiesto se presentará en cero. En todo caso **ECOCAPITAL** deberá documentar y probar la ocurrencia de la circunstancia; 4) La disposición final del servicio prestado por **ECOCAPITAL** será el relleno sanitario de Doña Juana o cualquier otro autorizado por la autoridad ambiental. Los residuos de riesgo anatomopatológicos, cortopunzantes, animal, químicos, Farmacéuticos, Químicos de tipo administrativo mediante incineración o termo destrucción a través de un proveedor tercero habilitado y certificado y su disposición final se realizará en celdas de seguridad debidamente habilitadas. Los RAEES se realizarán mediante programa de aprovechamiento y se realiza a través de proveedor certificado. Las destrucciones se harán cada vez que el usuario/suscriptor entregue los materiales con la periodicidad indicada; antes o después, según sus necesidades o cuando las circunstancias así lo exijan; 5) El alcance del servicio prestado por **ECOCAPITAL** para el tratamiento de los residuos de tipo biosanitarios será mediante esterilización y/o inactivación controlada operado por **ECOCAPITAL**.----------

OCTAVA. OBLIGACIONES DEL USUARIO/SUSCRIPTOR: 1. Suscribir y firmar el manifiesto de recolección en cada entrega de Residuos peligrosos; 2. Suscribir, previa revisión y aceptación, al momento de la recolección las cantidades, peso y tipo de residuos que objeto del presente contrato; 3. Mantener el acceso seguro y adecuado para la recolección de los residuos; según lo establece la normatividad vigente; 4. Entregar los Residuos Peligrosos conforme a la normativa aplicable de rotulados, bolsas y contenedores, a la ruta asignada, siguiendo los protocolos para la recolección externa indicada por la normativa ambiental y sanitaria vigente, manteniendo una correcta segregación de los residuos; 5 Respetar y cumplir con los horarios establecidos por **ECOCAPITAL** para la recolección de residuos; 6. Cumplir con los protocolos de seguridad en el trabajo (EPP) y bio seguridad por parte de las personas que entregan los residuos peligrosos; 7. Informar de manera fidedigna el tipo de residuos, volumen y/o cantidad en el formato RH1 y cualquier otro documente que se diligencie con la finalidad de dar certeza de su categoría de generador y residuos que se genera; 8. Mantener actualizada la información de contacto, recolección y demás datos personales del usuario debidamente actualizada para garantizar el cumplimiento del servicio; 9. Pagar oportunamente los valores contemplado en el presente contrato; 10. Pagar en caso de mora intereses equivalentes 2.5% Nominal Mes Vencido o una y media vez el interés bancario corriente sobre los salados a capital que se adeuden,; 10. De acuerdo a los horarios establecidos por ECOCAPITAL, se obliga a Informar aquellas situaciones que puedan afectar el proceso normal de recolección, tales como horarios, accesos, persona responsable de la entrega de los residuos, etc.----------

NOVENA. OBLIGACIONES DE ECOCAPITAL: 1. Realizar el pesaje de todos los residuos en cada recolección y registrarlos en los manifiestos, de conformidad a la normatividad vigente; 2. Dar cumplimiento a lo establecido en la normatividad ambiental y sanitaria vigente, en especial, lo previsto en la Resolución 1164 de 2002 (Manual de Procedimientos para la Gestión Integral de Residuos de riegos Biológico y similares en Colombia – MPGIRG), el Decreto Único Reglamentario 1076 de 2015 del Sector Ambiente y Desarrollo Sostenible y Decreto Único Reglamentario 780 de 2016 del Sector de la Salud y Protección Social, o cualquier norma que lo modifique, complemente, aclare, adicione, subrogue o sustituya; 3. Cumplir con la afiliación a EPS, ARL y Pensión de todo el personal que forma parte de la organización del servicio contratado; 4. Cumplir con las normas de seguridad Industrial en lo referente a elementos de protección personal para los empleados y el uso adecuado de herramientas y equipos de seguimiento y medición; 5. Asegurar la cadena de custodia y la debida gestión de los desechos peligrosos que le son entregados por los usuarios, siguiendo las medidas contempladas en las normas ambientales y sanitarias vigentes en cada una de las etapas de recolección, almacenamiento, disposición final y tratamiento; 6. Almacenar los residuos peligrosos recibidos de conformidad con la normatividad ambiental vigente, en zonas con acceso restringido y personal de seguridad; 7. Acreditar el plan de contingencia radicado por la autoridad ambiental competente; 8. Tener un plan de gestión integral de Residuos de riesgo Biológico y similares o (RESPEL) (radicado por la autoridad ambiental competente); 9. Garantizarle al usuario la disponibilidad de la información relacionada con las actas de disposición y tratamiento final de residuos para su consulta y descargue dentro de los términos previstos en la ley y/o reglamentos técnicos; 10. Reprogramar dentro de un plazo máximo de 15 días calendario aquellas frecuencias igual o inferior a dos veces que no se prestaron conforme a la programación previamente informada.----------

DÉCIMA. VALOR DEL CONTRATO Y FORMA DE PAGO: El usuario/suscriptor se compromete a pagar oportunamente el servicio al precio acordado dentro de los treinta (30) días siguientes a la emisión de la factura por parte de **ECOCAPITAL**. El valor de facturación mensual será igual a la siguiente formula: ----------

$$Costo\ Total\ Mensual = \sum[(Costo\ Unitario\ frecuencia)x\ (No.\ Frecuencias\ en\ el\ mes)) + (\sum(Costo\ Tratamiento\ por\ Kg)\ x\ (Kg\ Entregados\ por\ Usuario\ en\ el\ mes)]$$

Las Partes acuerdan que los precios de los servicios son los descritos en la primera parte que contiene las condiciones particulares al Servicio. El pago deberá realizarse mediante los medios establecidos por parte de **ECOCAPITAL**: transferencia electrónica, pago por botón PSE, consignación a la cuenta corriente No. 04818257098 BANCOLOMBIA S.A., pago a través de la plataforma NEQUI o cualquier medio que disponga para tal fin de la cual sea titular ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. E.S.P., o en la que éste le indique mediante comunicación escrita por los canales establecidos en este contrato para las facturaciones. **Parágrafo 1: ECOCAPITAL** podrá presentar cargos por Servicios omitidos o incorrectamente facturados hasta 30 (treinta) días calendario después de la conclusión del ciclo de facturación correspondiente. Dichos cargos por Servicios omitidos o incorrectamente facturados deberán ser debidamente acreditados por **ECOCAPITAL** una vez que los haga del conocimiento del usuario/suscriptor. **Parágrafo 2:** En caso de que surja una controversia en las cantidades estipuladas en las facturas, se contará con un de revisión, el cual será el siguiente: (i) Para que cualquier solicitud de revisión de facturas sea procedente, la misma deberá referirse exclusivamente al servicio que se preste bajo el presente Contrato, errores matemáticos de cálculo o de actualización de los servicios, pero en ningún caso será a los precios pactados por las partes en este contrato; (ii) Deberá hacerse dentro de los 60 días calendario siguientes a la fecha de pago de las facturas correspondientes. La queja o reclamo se hará por los canales comunicacionales que **ECOCAPITAL** dispone para PQR y este revisará las facturas objetadas para determinar su procedencia o improcedencia dentro de un plazo que no excederá de en un lapso de 15 días hábiles. Si **ECOCAPITAL** determina que la objeción es improcedente por no contener la factura errores matemáticos de cálculo, o bien que los mismos sean por los precios pactados en el contrato, en ese momento queda cerrado el proceso de objeción de facturas. En caso de que **ECOCAPITAL** determine que la objeción de usuario/suscriptor es procedente, **ECOCAPITAL** procederá a elaborar la correspondiente nota de crédito. ----------

DÉCIMA PRIMERA. DERECHOS DEL USUARIO/SUSCRIPTOR: El usuario/suscriptor tiene los siguientes derechos: 1. Pueden presentar peticiones, quejas y reclamos del servicio ante la siguiente dirección de correo: servicio@ecocapital.co ; en físico en la siguiente dirección: Carrera 19ª # 61-11 Barrio San Luis, Localidad de Teusaquillo; a través de la plataforma SIGRES en el módulo de PQR o nuestra página web, sección zona de clientes, PQR, o por nuestro Contact Center 6017462686 y **ECOCAPITAL** dará contestación en el término de quince (15) días hábiles a partir de la radicación; 2. Solicitar capacitaciones sobre el manejo integral de residuos peligrosos; 3. Efectuar inconformidades al manifiesto para lo cual el usuario/suscriptor dispondrá de cinco (5) días hábiles para radicar la solicitud una vez se haya suscrito el manifiesto a través de los canales comunicacionales establecidos para PQR .El usuario/suscriptor deberá presentar los soportes que evidencie la inconsistencia y en caso de corroborarse la misma y que no fue detectada al momento de la recolección, las partes suscribirán un acta aclaratoria y esta se anexará al manifiesto errado, pero en ningún caso se modificará el manifiesto. La corrección monetaria de la factura se efectuará a través de la correspondiente nota de crédito. ----------

DÉCIMA SEGUNDA. CONFIDENCIALIDAD: Los manifiestos y las actas que se elaboren en el marco del presente contrato, son de carácter confidencial, por lo tanto, **ECOCAPITAL** se obliga a no divulgar o poner en disposición de personas o empresas, cualquier información obtenida en desarrollo del contrato, salva autoridades administrativas y/o judiciales que lo requieran. Este compromiso mantendrá su vigencia aún después de finalizado este contrato. ----------

DÉCIMA TERCERA. MODIFICACIONES. ECOCAPITAL podrá modificar el presente contrato haciendo efectiva las siguientes garantías: a) Deber de informar al usuario y/o suscriptor de la modificación de la propuesta con un mes de antelación a la entrada de vigencia de la misma; b) Deberá permitir al usuario y/o suscriptor el ejercicio efectivo de su derecho a no aceptar la modificación de la propuesta, sin embargo de no expresar su inconformidad en el término de

diez (10) días hábiles posteriores a sus recepción mediante los canales autorizados de notificación, ésta se entenderá aceptada; c) Por resolución de autoridad competente.----------

DÉCIMA CUARTA. CESIÓN: EL contratante/usuario/suscriptor no podrá ceder en todo o en parte a persona natural o jurídica alguna, los derechos y obligaciones inherentes al presente contrato. **ECOCAPITAL** podrá ceder su posición en el presente contrato para el cual el CESIONARIO deberá acreditar el cumplimiento de las condiciones técnicas exigidas por la ley y los reglamentos para la presentación de los servicios que hacen parte del objeto del presente contrato. **Parágrafo:** En todo caso es deber del contratante/usuario/suscriptor informar a **ECOCAPITAL** de cualquier venta o traslado de la titularidad de la razón social o establecimiento, la omisión de su información constituye para **ECOCAPITAL** la existencia de la obligación solidaria entre el contratante/usuario/suscriptor y el nuevo propietario por los servicios que presente ECOCAPITAL.----------

DÉCIMA QUINTA. PROTECCIÓN DE DATOS. EL usuario/suscriptor autoriza a **ECOCAPITAL** para que utilice los datos suministrados en este formato de contrato y en el marco de la relación contractual de conformidad a lo enunciado en la política de tratamiento de datos publicada en nuestra página web www.ecocapital.co. Lo anterior en cumplimiento de la Ley 1581 de 2012 y Decreto 1377 de 2013. El usuario/suscriptor le asisten los derechos tales como son: conocer, actualizar, corregir o suprimir la información los cuales podrá ejercer enviando un correo a servicio@ecocapital.co en físico en la siguiente dirección: Carrera 19ª # 61-11 Barrio San Luis, Localidad de Teusaquillo; a través de la plataforma SIGRES en el módulo de PQR o nuestra página web, sección zona de clientes, PQR, o por nuestro Contact Center 6017462686.----------

DÉCIMA SEXTA. TERMINACIÓN ANTICIPADA DEL CONTRATO.- El contrato se dará por terminado por las causas que prevé la ley, y además por las siguientes: 1. Muerte o quiebra del usuario/suscriptor, reorganización o disolución si se trata de sociedad, 2. Incumplimiento del usuario/suscriptor en cualquiera de sus obligaciones; 3. Por decisión unilateral de **ECOCAPITAL**; 4. En cumplimento de una orden emitida por autoridad administrativa y/o judicial; 5. Por circunstancias de fuerza mayor, caso fortuito y/o razones de seguridad y/u orden público en los lugares de recolección; 6. Por decisión del usuario/suscriptor en el marco de las prórrogas automáticas que se contemplan en el presente contrato.----------

DÉCIMA SÉPTIMA. SUSPENSIÓN TEMPORAL: ECOCAPITAL podrá en cualquier momento y por circunstancias de fuerza mayor, caso fortuito y/o razones de seguridad y/u orden público y/o condiciones operativas suspender total o parcialmente la ejecución del presente contrato por un periodo no superior a seis (6) meses. Dicha decisión será comunicada por escrito al usuario/suscriptor indicando el alcance de dicha suspensión y la fecha tentativa de reanudación del contrato, Superado el plazo de seis (6) **ECOCAPITAL** podrá darlo por terminado. ----------

DÉCIMA OCTAVA. **DOMICILIO:** Para todos los efectos legales y contractuales se fija como domicilio contractual la ciudad de Bogotá D.C. ----------

DÉCIMA NOVENA. TITULO EJECUTIVO: Mérito ejecutivo. - Este documento presta mérito ejecutivo para hacer exigibles las obligaciones y prestaciones contenidas en él. En consecuencia, las Partes acuerdan en forma expresa, que éste junto con las facturas enviadas al usuario y constituirán título ejecutivo suficiente para que **ECOCAPITAL** exija por vía judicial el cumplimiento de las obligaciones dinerarias a cargo de aquel. ----------

VIGÉSIMA. MANIFESTACIÓN: Las partes manifiestan libremente, que han procedido a la lectura total y cuidadosa del presente documento, por lo que, en consecuencia, se obligan en todos sus órdenes y manifestaciones, en constancia se firma en la fecha indicada en la primera parte del contrato sobre las condiciones particulares inherentes al servicio.

POR ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. E.S.P.	**EL USUARIO/SUSCRIPTOR/CONTRATANTE**
 _____ **JUAN CARLOS VILLAVECES PARDO** Representante Legal.	_____ **NOMBRE** _____ **FIRMA** _____ **DOCUMENTO DE IDENTIFICACIÓN**

"ANEXO 1"

EL PRESENTE CONTRATO INCLUYE CLÁUSULAS DE PERMANENCIA MÍNIMA, PRÓRROGA AUTOMÁTICA Y/O VALORES A PAGAR POR TERMINACIÓN ANTICIPADA. UNA VEZ HAYAN SIDO ACEPTADAS EXPRESAMENTE POR EL USUARIO/SUSCRIPTOR, LO VINCULAN DE ACUERDO CON LAS CONDICIONES PREVISTAS EN EL PRESENTE CONTRATO

Yo, PAULA LUQUE, identificado como aparece abajo, mediante el presente "Anexo 1", que hace parte integral del contrato me obligo a estar vinculado con la empresa **ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. E.S.P.** en adelante **ECOCAPITAL** durante el lapso estipulado en la Cláusula Quinta del Contrato, a saber, un tiempo mínimo de doce (12) meses, además cuando venza el plazo indicado del presente contrato se renovará automáticamente por otro periodo igual y, finalmente, en caso de que decida terminar el contrato antes de que venza el periodo de permanencia mínima señalado en la cláusula Quinta del Contrato debo pagar los siguientes valores:

TABLA ANUAL DE PAGO POR TERMINACION ANTICIPADA POR CONCEPTO DE COSTO UNITARIO POR FRECUENCIA (Incluye: Recolección, transporte, almacenamiento, disposición final) Vigencia hasta Enero 31 de 2023														
SERVICIO	No. Frecuencias Contratadas x Mes	Costo Anual Proyectado 12 Meses	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6	MES 7	MES 8	MES 9	MES 10	MES 11	MES 12
COSTO UNITARIO POR FRECUENCIA (Incluye: Recolección, transporte, almacenamiento, disposición final)	1	$ 478.800	$ 39.900	$ 33.250	$ 29.925	$ 26.600	$ 23.275	$ 19.950	$ 16.625	$ 13.300	$ 9.975	$ 6.650	$ 3.325	$ -
	2	$ 957.600	$ 79.800	$ 66.500	$ 59.850	$ 53.200	$ 46.550	$ 39.900	$ 33.250	$ 26.600	$ 19.950	$ 13.300	$ 6.650	$ -
	3	$ 1.436.400	$ 119.700	$ 99.750	$ 89.775	$ 79.800	$ 69.825	$ 59.850	$ 49.875	$ 39.900	$ 29.925	$ 19.950	$ 9.975	$ -
	4	$ 1.915.200	$ 159.600	$ 133.000	$ 119.700	$ 106.400	$ 93.100	$ 79.800	$ 66.500	$ 53.200	$ 39.900	$ 26.600	$ 13.300	$ -
	5	$ 2.394.000	$ 199.500	$ 166.250	$ 149.625	$ 133.000	$ 116.375	$ 99.750	$ 83.125	$ 66.500	$ 49.875	$ 33.250	$ 16.625	$ -
	6	$ 2.872.800	$ 239.400	$ 199.500	$ 179.550	$ 159.600	$ 139.650	$ 119.700	$ 99.750	$ 79.800	$ 59.850	$ 39.900	$ 19.950	$ -
	7	$ 3.351.600	$ 279.300	$ 232.750	$ 209.475	$ 186.200	$ 162.925	$ 139.650	$ 116.375	$ 93.100	$ 69.825	$ 46.550	$ 23.275	$ -
	8	$ 3.830.400	$ 319.200	$ 266.000	$ 239.400	$ 212.800	$ 186.200	$ 159.600	$ 133.000	$ 106.400	$ 79.800	$ 53.200	$ 26.600	$ -

Conforme a lo anterior, declaro libremente y sin coacción alguna, que entiendo las condiciones precedentes y pagos correspondientes por terminación anticipada, por ello decido quedar vinculado voluntariamente por los doce meses de vigencia, a fin de obtener el siguiente descuento anual conforme a las frecuencias que se acuerden con **ECOCAPITAL** y que se muestran en el siguiente cuadro:

TABLA ANUAL DE COSTO UNITARIO POR FRECUENCIA (Incluye: Recolección, transporte, almacenamiento, disposición final) Vigencia hasta Enero 31 de 2023				
No. Frecuencias Contratadas x Mes	Costo Mensual según Frecuencia	Costo Anual Proyectado 12 Meses	Descuento Aplicado Permanencia en el Mes 12 (8.33%)	Total a Pagar Año
1	$ 39.900	$ 478.800	$ 39.900	$ 438.900
2	$ 79.800	$ 957.600	$ 79.800	$ 877.800
3	$ 119.700	$ 1.436.400	$ 119.700	$ 1.316.700
4	$ 159.600	$ 1.915.200	$ 159.600	$ 1.755.600
5	$ 199.500	$ 2.394.000	$ 199.500	$ 2.194.500
6	$ 239.400	$ 2.872.800	$ 239.400	$ 2.633.400
7	$ 279.300	$ 3.351.600	$ 279.300	$ 3.072.300
8	$ 319.200	$ 3.830.400	$ 319.200	$ 3.511.200

Queda entendido, conforme a la cláusula Quinta, que vencido el período de permanencia mínima, puedo dar por terminado el servicio en cualquier momento, manifestando mi intención de no continuar con el mismo, mediante comunicación escrita a **ECOCAPITAL** con una antelación de diez [10] días hábiles a la fecha de vencimiento del período de facturación. **ECOCAPITAL** procederá a suspender el servicio al vencimiento del período de facturación en que se

conozca la solicitud de terminación del contrato. Cuando la solicitud haya sido formulada con una antelación inferior a los diez [10] días señalados, **ECOCAPITAL** procederá al corte del servicio a más tardar al vencimiento del período de facturación siguiente al que se conozca la solicitud.

Autorizo expresamente a **ECOCAPITAL** con la suscripción del presente documento denominado "Anexo 1" a incluir los valores a pagar por terminación anticipada dentro de la factura correspondiente al servicio ofrecido.

Acepto,

PAULA LUQUE
_____
Usuario/suscriptor/contratante

1032459644
_____
Documento de identificación (NIT/CC/CE/OTRO)

_____
Firma

Bogotá.D.C28/02/2022
_____
Ciudad y Fecha



TOKEN: LLPjXWLPgZrsl+VDjuPE9pFYrqK51yXY

ALCALDIA MAYOR
DE BOGOTA D.C.
Departamento Técnico Administrativo
MEDIO AMBIENTE

RESOLUCIÓN No. 2517
POR MEDIO DE LA CUAL SE OTORGA UNA LICENCIA AMBIENTAL

EL Director del Departamento Administrativo del Medio Ambiente DAMA, en uso de sus facultades legales, en especial las conferidas por el Decreto 330 del 2003, en concordancia con la Ley 99 de 1993, el Decreto 1220 del 2005, la Resolución 2173 del 2003, Ley 99 de 1993, Decretos 1220 de 2005 y 948 de 1995, Resoluciones 058 de 2002, 1208 de 2003, 886 de 2004, Ley 9 de 1979, la Ley 430 de 1998 y específicamente, el Decreto 2676 de 2000 y

CONSIDERANDO

Que el 5 de marzo de 2004, bajo el radicado 8164, ECOCAPITAL atendiendo el requerimiento allega la información solicitada señalado que la dirección es la Calle 93 54-55 Sur localidad de Bosa. Como consecuencia la Subdirección Ambiental Sectorial hace entrega de los términos de referencia mediante Rad EE10832 del 20-5-04. Con radicado DAMA 22107 del 28-6-04 la empresa solicita modificar el alcance de los términos de referencia para la elaboración E.I.A., para incineración de residuos peligrosos, solicitud que fue atendida mediante Memorando SAS 1570 del 8 de julio de 2004 remitiendo los términos de referencia correspondientes a la incineración de residuos peligrosos, los cuales fueron remitidos con oficio EE18522 del 13 de septiembre de 2004.

Que mediante Auto 3181 del 3 de noviembre de 2004, se da inicio al tramite administrativo ambiental para el otorgamiento de licencia ambiental para la construcción, montaje y operación de la planta de incineración y tratamiento de alta eficiencia de residuos a favor de ECOCAPITAL S.A., ubicada en la Calle 93 54-55 Sur localidad de Bosa.

Que con radicado DAMA ER 41391 del 26 de noviembre de 2004, la UESP, informa la nueva dirección en la que se va a ubicar el proyecto es la Diagonal 16 A 123-52 en el Parque Industrial Meandro del Say. Posteriormente mediante el radicado ER 1079 del 13-1-05 esa entidad solicita apoyo y colaboración para el trámite de la citada licencia toda vez que según el citado escrito, la UESP tiene como obligación contractual colaborar con el concesionario las gestiones que deban adelantarse para la ejecución y cumplimiento del contrato.

Que mediante Auto No.2423 del 2 de septiembre de 2005, este Departamento dispuso declarar la perdida de fuerza ejecutoria del Auto No.3181 del 3 de noviembre de 2004, por el cual este Departamento dio inicio al tramite administrativo ambiental para el otorgamiento de licencia ambiental para la construcción, montaje y operación de la planta de incineración y tratamiento de alta eficiencia de residuos a favor de ECOCAPITAL S.A., ubicada en la Calle 93 54-55 Sur localidad de Bosa. Iniciar el trámite administrativo ambiental para el otorgamiento de licencia ambiental para la construcción, montaje y operación de la planta de incineración y tratamiento de alta eficiencia de residuos a favor de ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. E.S.P., ubicada en la Diagonal 16 A 123 – 52 Lote No.6, de la localidad de Fontibón y tener como parte integral dentro de las diligencias que se surten en el expediente DM -07-05-154, todos los documentos, información y estudios presentados por ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. E.S.P.

2517

Que la Subdirección Ambiental Sectorial, con concepto técnico No 7021 del 7 de septiembre de 2005, evaluó el Estudio de Impacto Ambiental presentado por ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. ESP., mediante el radicado 6498/05, y la información complementaria solicitada mediante los oficios DAMA 12262 de 25/05/05 y 113861 de 16/06/05, y presentada bajo los radicados 19282/05 y 23093/05.

Que el concepto técnico 7021/05 determina desde el punto de vista técnico que "El proyecto de recolección, transporte, almacenamiento y tratamiento de residuos hospitalarios y similares presentado por Ecocapital S.A. E.S.P se considera viable técnicamente.". y establece una serie de requisitos, términos, condiciones y obligaciones, las cuales debe dar cumplimiento la firma ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. ESP. .

Que mediante el Memorando SAS No.1783 del 9 de septiembre de 2005, la Subdirección Ambiental da alcance al concepto técnico 7021 del 7 de septiembre de 2005 y con propósito de que la información expuesta a continuación haga parte integral de la Resolución de Licencia Ambiental de Ecocapital S.A. E.S.P., en el presente memorando se consignan las obligaciones para la operación de la empresa, las cuales son producto del análisis del EIA y de la normatividad ambiental vigente (Decreto 2676/00, Resolución MMA-MS 1164/02, Resolución MMA 058/02 y Resolución MAVDT 886/04).

Que mediante Auto No.2533 del 7 de septiembre de 2005, se concluye que una vez revisado el expediente DM -07-05-154 se constató que se encuentra reunida oda la información necesaria para que este Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente proceda a resolver sobre el otorgamiento de la licencia ambiental de la empresa ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. E.S.P., de conformidad con el numeral 4º del artículo 23 del Decreto 1220 del 21 de abril de 2005, por el cual se reglamentó el título VIII de la Ley 99 de 1993, sobre licencias ambientales.

Que mediante Memorando del 13 de septiembre el Director del DAMA solicita a la Subdirección a la Subdirecciones Ambiental Sectorial y de Ecosistemas y Biodiversidad la aclaración de el concepto técnico 7021 del 7 de septiembre y los Memorando SAS 1789 del 9 de septiembre y el Memorando SEB 412 del 30 de agosto, todos de 2005 del 2005, en el sentido de determinar si las precisiones encontradas y contempladas en ellos, afectan la viabilidad del proyecto objeto del presente proceso de licenciamiento o si las mismas pueden ser subsanadas.

Que de la misma forma en el citado memorando se solicita revisar los plazos y la información solicitada en el concepto y los memorandos antes mencionados y señalar el enlace y la exigencia normativa en la que se sustentan las obligaciones y requerimientos contemplados en los documentos en cita. También recuerda que la recolección y transporte de los residuos peligrosos no son objeto de licencia ambiental por lo que considera que no es necesario enunciar las actividades a realizar en este sentido pues las normas son de obligatorio cumplimiento.

Finalmente señala el memorando en mención que se revise el Memo SEB 412, con el propósito de aclarar el área d influencia del proyecto, la eficacia y el Plan de Gestión Social y las medidas propuestas al Meandro del Say.

Que en cumplimiento lo solicitado mediante el Memo de la Dirección, la Subdirección Ambiental

Sectorial emite el concepto técnico SAS 8093 del 30 de septiembre de 2005 concluye que:

Que el proyecto estará ubicado en la diagonal 16 A No. 123 – 52, lote No. 6. Está en zona industrial al occidente de la ciudad, en la localidad 9 Fontibón, sector el Charco II.

Que Ecocapital Internacional S.A. pretende realizar almacenamiento y tratamiento de residuos infecciosos (Anatomopatológicos, biosanitarios, cortopuzantes y de animales) mediante incineración y desactivación de alta eficiencia.

Que adicional a lo anterior la empresa realiza recolección y transporte de los residuos infecciosos del generador a una planta de tratamiento; después de ser tratados, los residuos son transportados a la celda de seguridad del Relleno Sanitario Doña Juana.

Que respecto a las aclaraciones solicitadas, la Subdirección Ambiental sectorial mediante su concepto 8093/05 señala que con relación al concepto técnico 7021 de 07/09/05 es importante aclarar que las imprecisiones que se mencionan en el numeral 5 de éste, se relacionan con asuntos derivados del análisis técnico de la información presentada y que a su vez sustentan lo conceptuado, motivo por el cual se hace la aclaración punto por punto. (numeral 3.2. Aclaraciones).

Que en el capítulo de las conclusiones (numeral 3.3 del concepto técnico 8093/05), la Subdirección Ambiental Sectorial concluye que:

"

- De acuerdo con lo anotado en el numeral 3.2., las impresiones encontradas en la revisión de los documentos entregados por la empresa Ecocapital Ltda. no fueron aspectos relevantes para determinar la viabilidad del proyecto.

- La información que es conveniente conocer antes de iniciar la operación de la planta, es la información con la que la empresa debe contar antes de empezar a operar y debe ser conocida por el Dama con anterioridad para verificar su oportunidad.

  La información que se necesita obtener con los datos reales de la operación corresponde a aquella estimada o calculada y que posteriormente debe verificarse.

- Las actividades sujetas al otorgamiento de la Licencia Ambiental son el almacenamiento y tratamiento de residuos infecciosos, por lo que los aspectos relacionados con la recolección y transporte, a pesar de formar parte integral del proyecto, se tendrán en cuenta en la evaluación del Plan de Gestión Externa remitido por la Empresa semestralmente.

- En el Memorando 1783 del 9 de septiembre de 2005, se plasman las obligaciones que para la actividad, son establecidas en las normas ambientales vigentes, de estricto cumplimiento. "

Que de la misma forma, en el capitulo 4 del concepto en cita, la Subdirección Ambiental Sectorial

conceptúa desde el punto de vista técnico que:

"CONCEPTO TÉCNICO

4.1. La empresa Ecocapital S. A. E.S.P. debe remitir la siguiente información treinta (30) días hábiles antes de iniciar la operación:

a. Manual de operación del Incinerador, según lo establecido en la norma, que especifique las variables de operación y actividades de control y seguimiento para prevenir la generación *de olores y dioxinas y furanos.*

b. Estudio de Calidad del Aire de la Zona en las siguientes condiciones:

- ✓ *Tres estaciones de monitoreo de PTS (Partículas Totales en Suspensión) con equipos "Hig-Vol" ubicados según la rosa de los vientos de la siguiente manera: dos en la dirección prevaleciente del viento y otro en dirección contraria.*
- ✓ *El monitoreo debe hacer en forma continua veinticuatro (24) horas durante diez (10) días,* para un total de treinta (30) muestras.
- ✓ Los monitoreos de Dióxido de Azufre (SO_2) y Dióxido de Nitrógeno (NO_2) se deben hacer paralelamente con equipos tipo RAC (Muestreadores de tres gases).
- ✓ Los equipos "Hig-Vol" debe contar con cartas de calibración de fábrica vigentes y la correspondiente *verificación* de calibración en campo, horómetros, cartas de flujo y/o rotametros.
- ✓ Informar al DAMA como mínimo con cinco días hábiles de anticipación para la correspondiente auditoría de los muestreos en Calidad de aire para que tengan la respectiva validez.

c. Presentar los protocolos existentes para[1]:

- o Clasificar los residuos según el tratamiento a realizar
- o Garantizar condiciones de combustión total de los residuos
- o Verificar la gestión interna de residuos de los generadores y evitar así la recepción de residuos desactivados con sustancias cloradas.

d. *Identificar y evaluar los factores criticos que pueden causar conflictos con la comunidad, en* un escenario pesimista, para así prever las acciones a desarrollar en caso de que efectivamente se presenten.

4.2. La empresa Ecocapital S. A. E.S.P. debe cambiar en la propuesta de equipos de medición continua de Monóxido de Carbono el "Analizador de Celdas Electroquímicas" por el "Analizador Infrarrojo No Dispersivo", acorde con la *Resolución DAMA 1208/03 Artículo 12.*

4.3. La información requerida para el otorgamiento del permiso de emisiones se encuentra incluida en los documentos remitidos por la empresa, por lo que se considera viable técnicamente su otorgamiento.

4.4. Ecocapital deberá remitir la siguiente información dentro de los tres (3) meses siguientes a la iniciación de la operación:

a. Diagramas de flujo que incluyan todas las corrientes de entrada y salida de todas y cada una de las etapas del proceso, incluyendo las de control de emisiones y vertimientos, masa o volumen, temperatura, presión, tiempo estimado de la etapa, destino final, emisiones, vertimientos y residuos generados, cuantificados, de los siguientes ítems:
   - Residuos anatomopatológicos y de animales
   - Residuos cortopunzantes y biosanitarios
   - Uso de agua, incluyendo el área administrativa

b. Plan de Contingencia considerando lo siguiente:
   - Estrategias para el manejo de residuos cortopunzantes y biosanitarios, diferente a la incineración
   - Recepción de residuos inactivados con sustancias cloradas

c. Descripción detallada del laboratorio y de los análisis realizados.

d. Presentar un estudio de emisiones que incluya todos los parámetros de la normatividad vigente (Resoluciones MAVDT 058/00 y 886/04 y Resolución DAMA 1208/03) y continuar remitiendo los estudios conforme a los plazos y condiciones establecidas en la normatividad ambiental vigente. La empresa no podrá descargar al aire promedios de concentraciones superiores a las indicadas en las normas, para los siguientes contaminantes: Partículas Suspendidas Totales PST, Hidrocarburos Totales HCT, Compuestos gaseosos de Cloro inorgánico, Compuestos gaseosos de Flúor inorgánico, Óxidos de Azufre, Óxidos de Nitrógeno, Monóxido de Carbono, Mercurio y sus compuestos, Metales Pesados y Dioxinas y Furanos.

e. Presentar un modelo de dispersión refinado. Con base en los resultados del primer informe de emisiones es necesario que la empresa corra un modelo refinado (ISC o CTDMPLUS) para corto plazo, teniendo en cuenta los siguientes aspectos:
   - ✓ El caudal de salida de gases por la chimenea.
   - ✓ Este modelo debe ser corrido para partículas (MP), óxidos de azufre (SOx) y óxidos de nitrógeno (NOx).
   - ✓ La concentración de gases de salida así como su comparación contra los límites establecidos por la Resolución 1208 de 2003 del DAMA.
   - ✓ Comparar los resultados contra los promedios establecidos en la Tabla 1 de la resolución 1208 de 2003 del DAMA. Utilizar los registros meteorológicos correspondientes a los mismos períodos de tiempo.

- ✓ Incluir los efectos de los edificios cercanos en la corrida del modelo.
- ✓ *Entregar los listados de salida del modelo para todas las direcciones e identificar posibles receptores en el área de influencia.*
- ✓ Superponer los resultados del estudio de calidad de aire con los resultados del modelo corrido los cuales deben ser comparados contra la Resolución 1208/03.

f. Realizar un monitoreo de ruido ambiental, mientras la planta no esté en operación, que debe ser remitido al DAMA para evaluación.

4.5. Ecocapital deberá:

- Ocho (8) meses después de iniciar la operación de la planta, se deberá presentar un Estudio de Calidad del Aire de la Zona siguiendo las mismas condiciones del primer estudio entregado antes de iniciar operación, para verificar las concentraciones reportadas por el modelo.
- La empresa deberá reportar trimestralmente el avance de la implementación del Plan de Gestión Social, durante el primer año de ejecución del proyecto. Posteriormente, se debe reportar anualmente.
- Ecocapital S. A. E.S.P. debe diligenciar el Formulario Único de Registro de Vertimientos, conforme la Resolución DAMA 1074 de 1997.
- Ecocapital S.A. E.S.P. registrar los vehículos en el formato de valla y en el caso de contar con publicidad visible desde las vías de uso público deberá igualmente registrarla ante el DAMA.

4.6 Ecocapital debe dar estricto cumplimiento a las siguientes actividades:

- Unicamente podrá almacenar y tratar residuos hospitalarios infecciosos, es decir anatomopatológicos, de animales, cortopunzantes y biosanitarios, clasificados según la NFPA como tipo 4.
- La empresa debe informar la fecha de puesta en marcha del incinerador con treinta (30) días de anticipación.
- La empresa debe cumplir a cabalidad con el Decreto 2676/00, la Resolución MMA-MS 1164/02, la Resolución MMA 058/02 y la Resolución MAVDT 886/04 o la normatividad vigente.

- La empresa debe cumplir a cabalidad con lo establecido en el Plan de Manejo Ambiental, para lo cual deberá presentar los estudios, informes y caracterizaciones correspondientes a las actividades realizadas y que afecten el medio ambiente.

- La caracterización de dioxinas y furanos se realizará de acuerdo con lo establecido en la Res MAVDT 886/05 o la normatividad ambiental vigente.

- No se podrán manejar residuos diferentes a los estipulados en la Resolución de la Licencia Ambiental.

4.7. Hace parte integral de este concepto el memorando SEB de septiembre 29 de 2005. "

Que la Subdirección de Ecosistemas y Biodiversidad, mediante el memorando del 29 de septiembre de 2005, respecto a las aclaraciones solicitadas mediante memorando de Dirección del pasado 13 de septiembre, establece que:

" 1. REQUERIMIENTOS EIA Componente Técnico:

Teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

El área de influencia directa del proyecto es de máximo 200m y el Parque Ecológico Distrital Humedal Meandro del Say está ubicado en el punto opuesto de la dirección predominante del viento.
Este ecosistema es parte de la Estructura Ecológica Principal y su preservación es fundamental para el Distrito.
Basados en el principio de precaución y teniendo en cuenta que la incineración es una actividad de alto impacto ambiental, es necesario verificar la no afectación del humedal por la operación de la planta.

Se recomienda que en la dirección predominante del viento se hagan dos estudios de calidad del aire, previo y posterior a la operación, con el fin de verificar la no afectación del Meandro.

2. CONCEPTO EIA Componente Social:

Aunque con respecto a la zona de influencia directa (determinada por el modelo de dispersión de partículas), se precisa en memorando SAS 1951 que "no supera los 200 metros", según la información más reciente de Ecocapital avalada por esa Subdirección (la zona de uso estrictamente industrial), debe tenerse en cuenta la alta sensibilidad que históricamente han encontrado los proyectos de este carácter en su entorno social, en relación con las prevenciones que se generan en comunidades que cada vez están más informadas y sensibilizadas con respecto a los temas de impacto ambiental.

En este sentido, se considera conveniente integrar en el PMA unas fichas de gestión social con relación al proyecto que permitan contar con una identificación de actores cercanos a la zona del proyecto, así como poder informar y atender inquietudes que eventualmente la comunidad requiera y posibilitar la realización de visitas a la planta con universidades, instituciones y comunidad.

Se recomienda formular y ejecutar un PLAN DE GESTIÓN SOCIAL:

El Plan de Gestión Social debe contener objetivos precisos, programas que los ejecuten, estructura de responsabilidades, recursos a asignar, cronograma y mecanismos de evaluación y de interacción con la ciudadanía.

Dado lo anterior, el Plan de Gestión Social debe contemplar las siguientes acciones de orden preventivo y divulgativo:

.- Identificación de eventuales situaciones de conflicto con la comunidad, que se pudiesen presentar, relacionadas con la entrada en operación de la planta y planteamiento de alternativas de solución.

.- Programa de divulgación del proyecto en el área de influencia del mismo (según lo expresado en el punto anterior), a fin de dilucidar inquietudes que las comunidades perimetrales a la zona de influencia directa puedan tener. Este programa debe incluir la realización de una reunión pública de carácter informativo con anticipación de un mes antes de la entrada en operación de la planta. Para esto se debe realizar una identificación previa de las organizaciones sociales presentes en la zona de influencia perimetral (hasta 500 metros de distancia de la planta), especialmente las cívicas y las relacionadas con control social y gestión socioambiental. La reunión debe ser convocada utilizando medios eficaces, con la debida anticipación, citando al menos a los miembros dignatarios de cada Junta de Acción Comunal, organización cívica, veeduría ciudadana o grupo ambiental que se haya identificado dentro del área referida; con el propósito de presentar sustentadamente el proyecto y aclarar dudas sobre el mismo. Debe contarse con una agenda conocida previamente, y registrarse en una memoria el desarrollo de la misma. Si es del caso, responder por escrito inquietudes o hacerles llegar documentos que sean requeridos por los participantes.

  Programa de visitas de instituciones educativas, de investigación y comunidad en general, a fin de divulgar los procesos y beneficios del proyecto.

.- Organigrama de responsabilidades de la oficina o funcionario que pueda atender inquietudes ciudadanas. "

Que teniendo en cuenta que legalmente el transporte de residuos peligrosos no requiere licencia ambiental, el beneficiario de esta licencia deberá dar cumplimiento a lo establecido mediante el Decreto 1609 de 2002, expedida por el Ministerio de Transporte, para efectos del registro nacional para el transporte de mercancías peligrosas.

Que de conformidad con el numeral 9 del artículo 9 del Decreto 1220 del 2005: "la construcción y operación de instalaciones cuyo objeto sea el almacenamiento, tratamiento, aprovechamiento, recuperación y/o disposición final de residuos o desechos peligrosos", requiere licencia ambiental

En mérito de lo antes expuesto,

RESUELVE

PRIMERO: Otorgar Licencia Ambiental a la empresa ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. E.S.P., NIT 830133755-4, en cabeza de su representante legal o quien haga sus veces, para la construcción, montaje y operación de la planta de incineración y tratamiento de alta eficiencia, cuyo objeto es el almacenamiento y tratamiento de residuos hospitalarios infecciosos, es decir anatomopatológicos, de animales, cortopunzantes y biosanitarios, clasificados según la NFPA como tipo 4, ubicada en la Diagonal 16 A 123 – 52 Lote No.6, de la localidad de Fontibón, de conformidad con lo expuesto en la parte motiva de la presente providencia y a lo señalado en el Concepto Técnico No. 8093 del 30 de septiembre de 2005, y el Memorando SEB del 29 de septiembre del año en curso, los cuales hacen parte integral de la presente providencia.

PARÁGRAFO PRIMERO: La Licencia Ambiental que se otorga mediante la presente resolución no ampara ningún tipo de obra o actividad diferentes a las descritas en los documentos aportados en el presente trámite.

PARÁGRAFO SEGUNDO: El término de la Licencia Ambiental que se otorga mediante la presente providencia, es por la vida útil del proyecto, obra o actividad y cobija las fases de construcción, operación, mantenimiento, desmantelamiento y abandono y/o terminación pertinentes.

PARÁGRAFO TERCERO: La presente resolución lleva implícitos todos los permisos, autorizaciones y/o concesiones para el uso, aprovechamiento y/o afectación de los recursos naturales renovables, necesarios para el desarrollo y operación del proyecto objeto de la presente licencia ambiental.

SEGUNDO: La empresa ECOCAPITAL INTERNACIONAL S.A. E.S.P., en cabeza de su representante legal o quien haga sus veces, deberá dar estricto cumplimiento a las siguientes obligaciones:

1. La empresa Ecocapital S. A. E.S.P. debe remitir la siguiente información treinta (30) días hábiles antes de iniciar la operación:

   - Manual de operación del Incinerador, según lo establecido en la norma, que especifique las variables de operación y actividades de control y seguimiento para prevenir la generación de olores y dioxinas y furanos.
   - Estudio de Calidad del Aire de la Zona en las siguientes condiciones:
   - Tres estaciones de monitoreo de PTS (Partículas Totales en Suspensión) con equipos "Hig-Vol" ubicados según la rosa de los vientos de la siguiente manera: dos en la dirección

prevaleciente del viento y otro en dirección contraria.

- ✓ El monitoreo debe hacer en forma continua veinticuatro (24) horas durante diez (10) días, para un total de treinta (30) muestras.
- ✓ Los monitoreos de Dióxido de Azufre (SO_2) y Dióxido de Nitrógeno (NO_2) se deben hacer paralelamente con equipos tipo RAC (Muestreadores de tres gases).
- ✓ Los equipos "Hig-Vol" debe contar con cartas de calibración de fábrica vigentes y la correspondiente verificación de calibración en campo, horómetros, cartas de flujo y/o rotametros.
- ✓ Informar al DAMA como mínimo con cinco días hábiles de anticipación para la correspondiente auditoria de los muestreos en Calidad de aire para que tengan la respectiva validez.

- Presentar los protocolos existentes para:
  - o Clasificar los residuos según el tratamiento a realizar
  - o Garantizar condiciones de combustión total de los residuos
  - o Verificar la gestión interna de residuos de los generadores y evitar así la recepción de residuos desactivados con sustancias cloradas.
- Identificar y evaluar los factores críticos que pueden causar conflictos con la comunidad, en un escenario pesimista, para así prever las acciones a desarrollar en caso de que efectivamente se presenten.

2. La empresa Ecocapital S. A. E.S.P. debe cambiar en la propuesta de equipos de medición continua de Monóxido de Carbono el "Analizador de Celdas Electroquímicas" por el "Analizador Infrarrojo No Dispersivo", acorde con la Resolución DAMA 1208/03 Artículo 12.

3. La información requerida para el otorgamiento del permiso de emisiones se encuentra incluida en los documentos remitidos por la empresa, por lo que se considera viable técnicamente su otorgamiento.

4. Ecocapital deberá remitir la siguiente información dentro de los tres (3) meses siguientes a la iniciación de la operación:

- Diagramas de flujo que incluyan todas las corrientes de entrada y salida de todas y cada una de las etapas del proceso, incluyendo las de control de emisiones y vertimientos, masa o volumen, temperatura, presión, tiempo estimado de la etapa, destino final, emisiones, vertimientos y residuos generados, cuantificados, de los siguientes ítems:
  - o Residuos anatomopatológicos y de animales
  - o Residuos cortopunzantes y biosanitarios
  - o Uso de agua, incluyendo el área administrativa
- Plan de Contingencia considerando lo siguiente:

- Estrategias para el manejo de residuos cortopunzantes y biosanitarios, diferente a la incineración
- Recepción de residuos inactivados con sustancias cloradas

- Descripción detallada del laboratorio y de los análisis realizados.
- Presentar un estudio de emisiones que incluya todos los parámetros de la normatividad vigente (Resoluciones MAVDT 058/00 y 886/04 y Resolución DAMA 1208/03) y continuar remitiendo los estudios conforme a los plazos y condiciones establecidas en la normatividad ambiental vigente. La empresa no podrá descargar al aire promedios de concentraciones superiores a las indicadas en las normas, para los siguientes contaminantes: Partículas Suspendidas Totales PST, Hidrocarburos Totales HCT, Compuestos gaseosos de Cloro inorgánico, Compuestos gaseosos de Flúor inorgánico, Óxidos de Azufre, Óxidos de Nitrógeno, Monóxido de Carbono, Mercurio y sus compuestos, Metales Pesados y Dioxinas y Furanos.

- Presentar un modelo de dispersión refinado. Con base en los resultados del primer informe de emisiones es necesario que la empresa corra un modelo refinado (ISC o CTDMPLUS) para corto plazo, teniendo en cuenta los siguientes aspectos:
  - ✓ El caudal de salida de gases por la chimenea.
  - ✓ Este modelo debe ser corrido para partículas (MP), óxidos de azufre (SOx) y óxidos de nitrógeno (NOx).
  - ✓ La concentración de gases de salida así como su comparación contra los límites establecidos por la Resolución 1208 de 2003 del DAMA.
  - ✓ Comparar los resultados contra los promedios establecidos en la Tabla 1 de la resolución 1208 de 2003 del DAMA. Utilizar los registros meteorológicos correspondientes a los mismos períodos de tiempo.
  - ✓ Incluir los efectos de los edificios cercanos en la corrida del modelo.
  - ✓ Entregar los listados de salida del modelo para todas las direcciones e identificar posibles receptores en el área de influencia.
  - ✓ Superponer los resultados del estudio de calidad de aire con los resultados del modelo corrido los cuales deben ser comparados contra la Resolución 1208/03.
- Realizar un monitoreo de ruido ambiental, mientras la planta no esté en operación, que debe ser remitido al DAMA para evaluación.

5.- Ecocapital Internacional S.A., deberá:

- Ocho (8) meses después de iniciar la operación de la planta, se deberá presentar un Estudio de Calidad del Aire de la Zona siguiendo las mismas condiciones del primer estudio entregado antes de iniciar operación, para verificar las concentraciones

reportadas por el modelo.

- La empresa deberá reportar trimestralmente el avance de la implementación del Plan de Gestión Social, durante el primer año de ejecución del proyecto. Posteriormente, se debe reportar anualmente.

- Ecocapital Internacional S. A. E.S.P. debe diligenciar el Formulario Único de Registro de Vertimientos, conforme la Resolución DAMA 1074 de 1997.

- Ecocapital Internacional S.A. E.S.P. registrar los vehículos en el formato de valla y en el caso de contar con publicidad visible desde las vías de uso público deberá igualmente registrarla ante el DAMA.

6.- Ecocapital Internacional S.A. E.S.P. debe dar estricto cumplimiento a las siguientes actividades:

- Únicamente podrá almacenar y tratar residuos hospitalarios infecciosos, es decir anatomopatológicos, de animales, cortopunzantes y biosanitarios, clasificados según la NFPA como tipo 4.

- La empresa debe informar la fecha de puesta en marcha del incinerador con treinta (30) días de anticipación.

- La empresa debe cumplir a cabalidad con el Decreto 2676/00, la Resolución MMA-MS 1164/02, la Resolución MMA 058/02 y la Resolución MAVDT 886/04 o la normatividad vigente.

- La empresa debe cumplir a cabalidad con lo establecido en el Plan de Manejo Ambiental, para lo cual deberá presentar los estudios, informes y caracterizaciones correspondientes a las actividades realizadas y que afecten el medio ambiente.

- La caracterización de dioxinas y furanos se realizará de acuerdo con lo establecido en la Res MAVDT 886/05 o la normatividad ambiental vigente.

- No se podrán manejar residuos diferentes a los estipulados en la Resolución de la Licencia Ambiental.

7.- Integrar en el PMA unas fichas de gestión social con relación al proyecto que permitan contar con una identificación de actores cercanos a la zona del proyecto, así como poder informar y atender inquietudes que eventualmente la comunidad requiera y posibilitar la realización de visitas a la planta con universidades, instituciones y comunidad.

8.- Formular y ejecutar un PLAN DE GESTIÓN SOCIAL que deberá contemplar los siguientes aspectos:

- objetivos precisos, programas que los ejecuten, estructura de responsabilidades, recursos a asignar, cronograma y mecanismos de evaluación y de interacción con la ciudadanía.

- Además deberá contemplar las siguientes acciones de orden preventivo y divulgativo:

  - Identificación de eventuales situaciones de conflicto con la comunidad, que se pudiesen presentar, relacionadas con la entrada en operación de la planta y planteamiento de alternativas de solución.

  - Programa de divulgación del proyecto en el área de influencia del mismo (según lo expresado en el punto anterior), a fin de dilucidar inquietudes que las comunidades perimetrales a la zona de influencia directa puedan tener. Este programa debe incluir la realización de una reunión pública de carácter informativo con anticipación de un mes antes de la entrada en operación de la planta. Para esto se debe realizar una identificación previa de las organizaciones sociales presentes en la zona de influencia perimetral (hasta 500 metros de distancia de la planta), especialmente las cívicas y las relacionadas con control social y gestión socioambiental. La reunión debe ser convocada utilizando medios eficaces, con la debida anticipación, citando al menos a los miembros dignatarios de cada Junta de Acción Comunal, organización cívica, veeduría ciudadana o grupo ambiental que se haya identificado dentro del área referida; con el propósito de presentar sustentadamente el proyecto y aclarar dudas sobre el mismo. Debe contarse con una agenda conocida previamente, y registrarse en una memoria el desarrollo de la misma. Si es del caso, responder por escrito inquietudes o hacerles llegar documentos que sean requeridos por los participantes.

  - Programa de visitas de instituciones educativas, de investigación y comunidad en general, a fin de divulgar los procesos y beneficios del proyecto.

  - Organigrama de responsabilidades de la oficina o funcionario que pueda atender inquietudes ciudadanas.

PARAGRAFO: Los dos (2) estudios a realizar para verificar la no afectación del Meandro del Say corresponden a los requeridos en el presente artículo numerales 1°, inciso tercero, y 5°, inciso primero, del presente artículo.

TERCERO: La Licencia Ambiental que se otorga mediante la presente providencia, sujeta a su beneficiario, al cumplimiento del Plan de Manejo Ambiental incluido el Estudio de Impacto Ambiental, a y a presentar periódicamente o a solicitud de este Departamento, los estudios, informes y caracterizaciones correspondientes de las actividades realizadas y que afecten al medio ambiente de conformidad con las normas legales vigentes.

CUARTO: La Licencia Ambiental que se otorga mediante la presente resolución no exime al beneficiario de tramitar ante otras entidades y obtener de las mismas, los permisos y autorizaciones diferentes a los ambientales que se requieran para el desarrollo de la actividad objeto de la licencia ambiental.

2517

QUINTO: En caso de detectarse, durante la etapa de ejecución, efectos ambientales no previstos, la empresa deberá informar de tales hechos al DAMA para que este Departamento determine y exija la adopción de las medidas correctivas que considere necesarias sin perjuicio de las medidas que deba adoptar para evitar, corregir o compensar los efectos ambientales negativos.

SEXTO: Fijar la presente providencia en un lugar público de la Entidad, remitir copia a la Alcaldía correspondiente para que surta el mismo trámite y publicarla en el Boletín que para el efecto disponga el DAMA., lo anterior en cumplimento del artículo 71 de la Ley 99 de 1993.

SEPTIMO: En contra de la presente resolución procede recurso de reposición, en los términos y condiciones previstos en los artículos 51 y 52 del Código Contencioso Administrativo.

NOTIFÍQUESE, PUBLÍQUESE Y CÚMPLASE

Dado en Bogotá, D.C., 03 OCT. 2005

RAUL ESCOBAR OCHOA
DIRECTOR

Aprobó: María del Pilar Acosta Barrios
Exp.07-05-154 L.A. /9-9-05
ECOCAPITAL INTERNACINAL S.A.

No	EMPRESA	DIRECCIÓN	TELEFONO	ACTO ADMINISTRATIVO	EXPEDIENTE	ACTIVIDAD APROBADA	TIPO DE RESIDUO APROBADO
1	ASOCIACIÓN DE RECICLADORES PUERTA DE ORO	CLL 42F SUR N 84 - 10	5793487 310 3164651	RESOLUCIÓN No 3920 DEL 26/10/2021	SDA-07-2021-694	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO	PILAS, BATERÍAS RECARGABLES Y ACUMULADOR ES CON CONTENIDO DE MERCURIO, CADMIO, PLOMO, U OTRA SUSTANCIA PELIGROSA, PANTALLAS DE CRISTAL LÍQUIDO (LCD), CARTUCHOS DE TÓNER O TINTA LÍQUIDA, VIDRIOS CON CONTENIDO DE PLOMO DE TUBOS DE RAYOS CATÓDICOS, LUMINARIAS, RESIDUOS RESULTANTES DE LAS OPERACIONES DE ELIMINACIÓN DE DESECHOS INDUSTRIALES EPP'S
2	BOGOTANA DE MANGUERAS	KR 33 N 8 - 07/27	3609931 3703557 2012539	RESOLUCIÓN No 1326 DEL 07/06/2005 MODIFICADA RESOLUCIÓN No 3995 DEL 11/05/2010	DM-07-2004-295	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO	ACEITE USADO
3	CLARIOS ANDINA S.A.S. - ANTES MAC JHONSON CONTROLS DE COLOMBIA SAS	CLL 17 N 69 - 34	4052520	RESOLUCIÓN NO 1297 DEL 23/08/2013 MODIFICADA POR RESOLUCIÓN 00448 DEL 19/03/2019	SDA-07-11-1992	ALMACENAMIENTO	BATERIAS USADAS ACIDO Y PLOMO
4	CLICK ON GREEN	KR 132 N 22A - 57 BG 5	4775944	RESOLUCIÓN No 1265 DEL 15/08/2013	SDA-07-2012-1195	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO	RAEE UNICAMENTE: EQUIPOS DE TELECOMUNICACIONES EN DESUSO COMPUTADORES Y EQUIPOS PERIFERICOS ESCANERES, FAXES, SERVIDORES, COPIADORAS Y PROYECTORES
5	COMPUTADORES PARA EDUCAR	CLL 17 A N 69 F-49	3442258 2921032	RESOLUCIÓN No 7253 DEL 25/11/2010	SDA-07-2009-325	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO DISPOSICION FINAL A TERCEROS	RAEE UNICAMENTE COMPUTADORES

6	E WASTE SOLUTIONS S.A.S.	KR 33 N 12 B - 89	2478161	RESOLUCIÓN No 02092 DEL 25/10/2015	SDA-07-2014-5107	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO	RESIDUOS DE APARATOS ELÉCTRICOS Y ELECTRÓNICOS – RAEE, ESPECIFICAMENTE: GRANDES ELECTRODOMÉSTICOS (QUE NO CONTENGAN SUSTANCIAS AGOTADORAS DE LA CAPA DE OZONO – SAO), PEQUEÑOS ELECTRODOMÉSTICOS, EQUIPOS INFORMÁTICOS Y DE TELECOMUNICACIÓN, APARATOS ELÉCTRICOS DE CONSUMO, HERRAMIENTAS ELÉCTRICAS Y ELECTRÓNICAS, JUGUETES EQUIPOS DEPORTIVOS Y DE TIEMPO LIBRE, EQUIPOS MÉDICOS NO CLASIFICADOS COMO RESIDUOS INFECCIOSOS, INSTRUMENTOS DE MEDIDA Y DE CONTROL Y MÁQUINAS EXPENDEDORAS DE BEBIDAS Y COMIDAS
7	ECOCAPITAL SA ESP	DG 16 A N 123 - 52	3685090	RESOLUCIÓN No 2517 DEL 03/10/2005	DM-07-05-154	ALMACENAMIENTO	RESIDUOS HOSPITALARIOS INFECCIOSOS - CLASIFICADOS SEGÚN LA NFPA TIPO 4: ANATOMOPATOLOGICOS DE ANIMALES CORTOPUNZANTES BIOSANITARIOS
8	ECOLCIN	KR 43 N 11 - 27	3689066	RESOLUCIÓN NO 1316 DEL 07/06/2005 RESOLUCIÓN NO 2792 DEL 2006 MODIFICADA RESOLUCIÓN NO 0011 DEL 06/01/2011	DM-07-2006-1355 DM-07-2005-279	ALMACENAMIENTO TRATAMIENTO APROVECHAMIENTO	ACEITE USADO BORRAS HIDROCARBURADAS
9	ECOSISTEMA SAS	KR 31 N 9 55	6016060	RESOLUCIÓN No 00208 del 27/01/2020	SDA-07-2020-25	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO	A1180 • GRANDES ELECTRODOMÉSTICOS: FOTOCOPIADORAS, CALENTADORES, VENTILADORES, AIRES ACONDICIONADOS, MICROONDAS, LAVADORAS, EQUIPOS DE SONIDO, HORNOS ELÉCTRICOS. A1180 • PEQUEÑOS ELECTRODOMÉSTICOS: PLANCHAS, TOSTADORAS, CAFETERAS, MÁQUINAS DE AFEITAR, CELULARES, SECADORES, SÁNDWICHES, TELÉFONOS, LICUADORAS, ASPIRADORAS.

							A1180 • EQUIPOS ELECTRÓNICOS: RADIOS, CÁMARAS FOTOGRÁFICAS Y DE VIDEO, REPRODUCTORES DE SONIDO, CONTESTADORES TELEFÓNICOS,3 CALCULADORAS.
							A1180 • EQUIPOS DE INFORMÁTICA Y TELECOMUNICACIONES: COMPUTADORES DE MESA, COMPUTADORES PORTÁTILES, TELEVISORES, IMPRESORAS, TELEFAX, UPS, TARJETAS DE CIRCUITO IMPRESO TCI
							A1180 • EQUIPOS DEPORTIVOS Y DE DISTRACCIÓN: CONSOLAS DE JUEGO, MÁQUINAS TRAGAMONEDAS, JUGUETES ELECTRÓNICOS.
							A1180 • EQUIPOS ELÉCTRICOS: EQUIPOS DE SOLDADURA, HERRAMIENTAS ELÉCTRICAS, ESTUFA ELÉCTRICA.
							A1180 • INSTRUMENTOS DE ILUMINACIÓN Y ALUMBRADO: TUBOS FLUORESCENTES, TUBOS COMPACTOS, BOMBILLAS.
							A1180 • ELEMENTOS DE IMPRESIÓN: TÓNER, CARTUCHOS.
						ALMACENAMIENTO	ACUMULADORES DE ENERGÍA: BATERÍAS PLOMO ÁCIDO, BATERÍAS RECARGABLES, BATERÍAS NI-CD, PILAS ALCALINAS
10	ELINTE S.A.	CLL 8 N 33 - 11	2374126 5657991	RESOLUCIÓN No 11 de 1999 RESOLUCIÓN No 1492 DEL 14/07/2000	DM-07-1999-11	ALMACENAMIENTO DISPOSICIÓN FINAL (INCINERACIÓN)	RESIDUOS ALTAMENTE COMBUSTIBLE Y COMBUSTIBLES DE ORIGEN DOMÉSTICO Y COMERCIAL, ACEITES USADOS. AUTORIZADOS: TIPO 0, 1, 2 Y 3 DE LA CLASIFICACIÓN NFPA.
11	ESAPETROL	CLL 59 A BIS SUR N 81 D 45	7750882 7751200	RESOLUCIÓN NO 2890 DEL 29/12/2000 RESOLUCIÓN NO 0367 DEL 04/04/2006 MODIFICADA RESOLUCIÓN NO 0461 DEL 2007	DM-07-2055-286 DM-06-2006-1090 DM-07-2000-2340	ALMACENAMIENTO Y TRATAMIENTO	ACEITE USADO
							AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES, AGUAS HIDROCARBURADAS, AGUAS DE ALTA CONDUCTIVIDAD AGUAS CON ALTA DQO Y DBO, AGUAS RESIDUALES DE PROCESOS PRODUCTIVOS DE DIFERENTES SECTORES E INDUSTRIAS QUE REQUIERAN DEL SERVICIOEX SITU.

						ALMACENAMIENTO Y DISPOSICIÓN FINAL	LODOS Y BORRAS HIDROCARBURADAS, PIEZAS IMPREGNADAS DE HIDROCARBUROS COMO FILTROS, EMPAQUES, CANECAS PIEZAS MECÁNICAS, FILTROS DE ACEITE, RECIPIENTES PLÁSTICOS Y METÁLICOS DE LUBRICANTES, GRASAS E HIDROCARBUROS. MATERIAL HIDROCARBURADO INCINERABLE COMO ESTOPAS GUANTES TRAPOS MATERIAL OLEOFILICO ASERRIN. RESIDUOS LIQUIDOS PELIGROSOS DE HIDROCARBUROS, LO QUE INVOLUCRA LOS DIFERENTES HIDROCARBUROS CONTAMINADOS O RESIDUALES. RESIDUOS DE CAUCHO Y HULE PRINCIPALMENTE LLANTAS Y MANGUERAS. ELECRICOS COMO BATERIAS Y PILAS, MATERIALES QUE SERAN ENTREGADOS PARA SU DISPOSICIÓN FINAL
12	GAIA VITARE SAS	CR 123 N 15 -35/45 BG 5, 7, 8 Y 9 CAMINOS DE SALAZAR	4216592 4216593	RESOLUCIÓN No 1634 DEL 04/11/2004	SDA-07-2003-741	1. ALMACENAMIENTO Y APROVECHAMIENTO	1. RAEES
							1. GASES REFRIGERANTES TIPO CFC, HCFC y HFC dentro de los cuales se precisan R-12, R-22, R32, R-134 A, R-141B, R-290, R-407C, R-410A, R-502, R-507, R-600, R-600A, R-707, R-744, R-1234yf Y R-1234ze.
						2. ALMACENAMIENTO	Y2/A4010 DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN Y PREPARACIÓN DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y3/A4010 DESECHOS DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS FARMACÉUTICOS
							Y5/A4040 DESECHOS RESULTANTES DE LA FABRICACIÓN, PREPARACIÓN Y UTILIZACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS PARA LA PRESERVACIÓN DE LA MADERA
							Y6 DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN, PREPARACIÓN Y LA UTILIZACIÓN DE DISOLVENTES ORGÁNICOS. Y8/A3020 DESECHOS DE ACEITES MINERALES NO APTOS PARA EL USO AL QUE ESTABAN DESTINADOS.

							Y9/A4060 MEZCLAS Y EMULSIONES DE DESECHOS DE ACEITE Y AGUA O DE HIDROCARBUROS Y AGUA. Y10/A3180 SUSTANCIAS Y ARTÍCULOS DE DESECHO QUE CONTENGAN, OES TEN CONTAMINADOS, POR BIFENILOS POLICLORADOS (PCB), TERFELINOS POLICLORADOS (PCT) O BIFENILOS POLIBROMADOS (PBB).
							Y11/A3190 RESIDUOS ALQUITRANADOS RESULTANTES DE LA REFINACIÓN, DESTILACIÓN O CUALQUIER OTRO TRATAMIENTO PIROLÍTICO.
							Y12/A4070 DESECHOS RESULTANTES PRODUCCIÓN, PREPARACIÓN, Y UTILIZACIÓN DE TINTAS, COLORANTES, PIGMENTOS, PINTURAS, LACAS O BARNICES Y13/A3050 DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN, PREPARACIÓN Y UTILIZACIÓN DE RESINAS, LÁTEX, PLASTIFICANTES O COLAS Y ADHESIVOS.
							Y16. DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN, PREPARACIÓN Y UTILIZACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES PARA FINES FOTOGRÁFICOS. Y17. DESECHOS RESULTANTES DEL TRATAMIENTO DE SUPERFICIES DE METALES Y PLÁSTICOS
							Y22. DESECHOS QUE TENGAN COMO CONSTITUYENTES: COMPUESTOS DE COBRE. Y23. DESECHOS QUE TENGAN COMO CONSTITUYENTES: COMPUESTOS DE ZINC
							Y26/A1010/A1020 DESECHOS QUE TENGAN COMO CONSTITUYENTES: CADMIO Y COMPUESTOS DE CADMIO.
							Y27/A1010/A1020 DESECHOS QUE TENGAN COMO CONSTITUYENTES: ANTIMONIO Y COMPUESTOS DE ANTIMONIO
							Y29/A1010/A1030 DESECHOS QUE TENGAN COMO CONSTITUYENTES: MERCURIO Y COMPUESTOS DE MERCURIO.
							Y31/A1010/A1020 DESECHOS QUE TENGAN COMO CONSTITUYENTES: PLOMO Y COMPUESTOS DE PLOMO.

							Y35/A4090 SOLUCIONES BÁSICAS O BASES EN FORMA SÓLIDA
							2. Y39/A3070 FENOLES, COMPUESTOS FENÓLICOS, CON INCLUSIÓN DE CLOROFENOLES2.
							Y40/A3080 ETERES
							Y41/A3150 SOLVENTES ORGÁNICOS HALOGENADOS
							Y42/A3140 DISOLVENTES ORGÁNICOS CON EXCLUSIÓN DE DISOLVENTES HALOGENADOS
							A1050 LODOS GALVÁNICOS
							A1060 LÍQUIDOS DE DESECHO DEL DECAPAJE DE METALES
							A1070 RESIDUOS DE LIXIVIACIÓN DEL TRATAMIENTO DEL ZINC, POLVOS Y LODOS COMO JAROSITA, HERMATITES, ETC.
							A1080 RESIDUOS DE DESECHOS DE ZINC NO INCLUIDOS EN LA LISTA B, QUE CONTENGAN PLOMO Y CADMIO EN CONCENTRACIONES TALES QUE PRESENTEN CARACTERÍSTICAS DEL ANEXO III.
							A1110 SOLUCIONES ELECTROLÍTICAS USADAS DE LAS OPERACIONES DE REFINACIÓN Y EXTRACCIÓN ELECTROLÍTICA DEL COBRE
							A1120. LODOS RESIDUALES, EXCLUIDOS LOS FANGOS ANÓDICOS, DE LOS SISTEMAS DE DEPURACIÓN ELECTROLÍTICA DE LAS OPERACIONES DE REFINACIÓN Y EXTRACCIÓN ELECTROLÍTICA DEL COBRE
							A1130. SOLUCIONES DE ÁCIDOS PARA GRABAR USADA QUE CONTENGAN COBRE DISUELTO.
							A1140 DESECHOS DE CATALIZADORES DE CLORURO CÚPRICO Y CIANURO DE COBRE.
							A1150 CENIZAS DE METALES PRECIOSOS PROCEDENTES DE LA INCINERACIÓN DE CIRCUITOS IMPRESOS NO INCLUIDOS EN LA LISTA B
							A1160 ACUMULADORES DE PLOMO DE DESECHO, ENTEROS O TRITURADOS

							A1170 ACUMULADORES DE DESECHO SIN SELECCIONAR EXCLUIDAS MEZCLAS DE ACUMULADORES SOLO DE LA LISTA B. LOS ACUMULADORES DE DESECHO NO INCLUIDOS EN LA LISTA B QUE CONTENGAN CONSTITUYENTES DEL ANEXO I EN TAL GRADO QUE LOS CONVIERTAN EN PELIGROSOS.
							A1180. MONTAJES ELÉCTRICOS Y ELECTRÓNICOS DE DESECHO O RESTOS DE ESTOS QUE CONTENGAN COMO COMPONENTES COMO ACUMULADORES Y OTRAS BATERÍAS INCLUIDOS EN LA LISTA A, INTERRUPTORES DE MERCURIO, VIDRIOS DE TUBOS DE RAYOS CATÓDICOS Y OTROS VIDRIOS ACTIVADOS Y CAPACITADORES DE PCB, O CONTAMINADOS CON CONSTITUYENTES DEL ANEXO I (POR EJEMPLO; CADMIO, MERCURIO, PLOMO, BIFENILO POLICLORADO) EN TAL GRADO QUE POSEAN ALGUNA DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL ANEXO III.
							A2010. DESECHOS DE VIDRIO DE TUBOS DE RAYOS CATÓDICOS Y OTROS VIDRIOS ACTIVADOS
							A2030. DESECHOS DE CATALIZADORES, PERO EXCLUIDOS LOS DESECHOS DE ESTE TIPO ESPECIFICADOS EN LA LISTA B.
							A3010 DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN O EL TRATAMIENTO DE COQUE DE PETRÓLEO Y ASFALTO
							A3030.DESECHOS QUE CONTENGAN ESTÉN INTEGRADOS O ESTÉN CONTAMINADOS POR LODOS DE COMPUESTOS ANTIDETONANTES CON PLOMO
							A3040. DESECHOS DE LÍQUIDOS TÉRMICOS (TRANSFERENCIA DE CALOR)
							A3060. NITROCELULOSA DE DESECHO
							A3200. MATERIAL BITUMINOSO (DESECHOS DE ASFALTO) CON CONTENIDO DE ALQUITRÁN RESULTANTES DE LA CONSTRUCCIÓN Y EL MANTENIMIENTO DE CARRETERAS
							A4120. DESECHOS QUE CONTIENEN, CONSISTEN O ESTÁN CONTAMINADOS CON PERÓXIDOS.

							A4130. ENVASES Y CONTENEDORES DE DESECHOS QUE CONTIENEN SUSTANCIAS INCLUIDAS EN EL ANEXO I, EN CONCENTRACIONES SUFICIENTES COMO PARA MOSTRAR LAS CARACTERÍSTICAS PELIGROSAS DEL ANEXO III.
							A4160. CARBONO ACTIVADO CONSUMIDO NO INCLUIDO EN LA LISTA B.
						TRATAMIENTO	RESIDUOS DE APARATOS ELÉCTRICOS Y ELECTRÓNICOS RAEE SOMETIDOS A TRITURACIÓN
							PILAS SALINAS Y ALCALINAS SOMETIDAS A TRITURACIÓN
							CARTUCHOS DE TÓNER SOMETIDOS A DESENSAMBLE Y EXTRACCIÓN MANUAL DEL POLVO.
13	INDUSTRIAS FIQ SAS	TV 124 N 18 A -12	4214918	RESOLUCIÓN No 108 DEL 31/01/2007	DM-07-04-928	ALMACENAMIENTO Y TRATAMIENTO	SOLVENTES USADOS
14	INGENIERIA Y RECICLAJE SAS	KR 80 N 16 D - 11	4128607	RESOLUCIÓN NO 2847 DEL 16/12/2015 (CESIÓN RESOLUCIÓN NO 2699 DEL 11/10/2005 Y RESOLUCIÓN NO 3075 DEL 12/04/2010 DE DOMINGUEZ SANCHEZ S.A.)	DM-07-2005-1393	ALMACENAMIENTO TRATAMIENTO	ACEITES USADO
15	LASEA SOLUCIONES EU	KR 80 N 16 D - 11	2929329	RESOLUCIÓN NO 3010 DEL 28/12/2005 MODIFICACIÓN RESOLUCIÓN NO 933 DEL 2008	DM-07-04-1223	ALMACENAMIENTO DISPOSICIÓN FINAL	RESIDUOS PLÁSTICOS Y FILTROS PARA ACEITE PROVENIENTES PRINCIPALMENTE DE LAS ACTIVIDADES DE LUBRICACIÓN AUTOMOTRIZ
							DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN Y REPARACIÓN DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS.

							MEZCLAS Y EMULSIONES DE DESECHOS DE ACEITE Y AGUA O DE HIDROCARBUROS Y AGUA CON EXCEPCIÓN DE LODOS CON COMPONENTES ORGANICOS. DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN, PREPARACIÓN Y UTILIZACIÓN DE TINTAS, COLORANTES, PIGMENTOS, PINTURAS, LACAS O BARNICES. DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCION, PREPARACION Y UTILIZACIÓN DE RESINAS, LATES, PLASTIFICANTES O COLAS Y ADHESIVOS.
							RESIDUOS ELECTRICOS, ELECTRÓNICOS Y DE TELECOMUNICACIONES
							ACUMULADORES
							BATERIAS NIQUEL-CADMIO Y/O BATERIAS SECAS
							TUBOS FLUORESCENTES Y LAMPARAS DE MERCURIO
16	LITO LTDA	CLL 12 B N 36 - 81	4057373	RESOLUCIÓN NO 056 DEL 29/01/2004 MODIFICACIÓN RESOLUCIÓN NO 4179 DEL 27/12/2007	DM-07-2003-655	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO DISPOSICIÓN FINAL A TRAVES DE TERCEROS	DESCARGA, ALMACENAMIENTO, MUESTREO,
							ANALISIS DE PCBS (EN ACEITE DIELECTRICO Y EQUIPOS ELECTRICOS EN DESUSO), MARCACION Y REPARACION DE EQUIPOS CONTAMINADOS, REEMBALAJE, ALMACENAMIENTO TEMPORAL (EN EL DEPOSITO DE SEGURIDAD HASTA LA ELIMINACIÓN POR PARTE DEL PROPIETARIO DEL RESIDUO), SEPARACIÓN Y DESHUESE DE MATERIALES LIBRES DE PCBS Y APROVECHAMIENTO DE MATERIAL EN BOMBILLAS DE MERCURIO, LOS RESIDUOS DE BETERIAS, PILAS Y ELEMENTOS DE CADMIO,
							NIQUEL, LITIO, PLOMO, PILAS ALCALINAS, RESIDUOS ELECTRÓNICOS Y SAOS.
17	METALES PROCESADOS E.U.	CL 128 C N 51 - 35	6276352	RESOLUCIÓN No 03307 DEL 20/11/2019	DM-06-2007-602	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO	LIQUIDOS DE REVELADO Y FIJADO DE PELICULAS FOTOGRÁFICAS
18	OMNIUM MULTISOCIEDADES SAS	CLL 22 C N 129 A - 10	4800421	RESOLUCIÓN NO 1375 DEL 10/06/2008	DM-06-07-671	ALMACENAMIENTO Y APROVECHAMIENTO	LIQUIDOS DE REVELADO Y FIJADO DE PELICULAS FOTOGRÁFICAS

19	PLANETA VERDE LTDA	CR 65 A N 4 G - 59	2606062	RESOLUCIÓN NO 6491 DEL 03/09/2010 MODIFICACIÓN RESOLUCIÓN NO 1782 DEL 30/09/2015	SDA-07-2008-3121 SDA-08-2008-3971 SDA-08-2015-3252	1. ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO	RESIDUOS DE APARATOS ELECTRICO Y ELECTRÓNICOS - RAEE QUE NO CONTENGAN NINGUNA DE LAS SIGUIENTES SUSTANCIAS: POLICLOROBIFENILOS (PCB), SUSTANCIAS
							AGOTADORAS DE LA CAPA DE OZONO (SAO) Y CLOROFLUOROCARBUROS (CFC)
						2. ALMACENAMIENTO	Y6. RESIDUOS LIQUIDOS Y SOLIDOS IMPREGNADOS CON DISOLVENTES (VARSOL, THINER, CETONAS, KEROSENES, GASOLINA, ALCOHOLES)
							Y12. RESIDUOS DE PINTURAS, RESINAS Y TINTAS
							Y8-Y9. RESIDUOS LIQUIDOS Y SOLIDOS IMPREGNADOS CON LUBRICANTES A BASE DE HIDROCARBUROS
							Y31/Y22/Y20/A1180. RESIDUOS ELECTRICOS Y ELECTRÓNICOS DE EQUIPOS DE COMUNICACIÓN Y COMPUTADORES: CIRCUITOS IMPRESOS, MONITORES, BATERIAS
							Y29. LAMPARAS FLUORESCENTES A1170/Y26/Y29. PILAS
							Y31. BATERIAS PLOMO ÁCIDO
20	PROCESOS INDUSTRIALES REUTILIZABLES LTDA - PROUTILES LTDA	KR 92 N 64 C - 65 BG 25	4812321 2600084	RESOLUCIÓN NO 0025 DEL 16/01/2013	SDA-07-11-2111	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO	RAEE
21	RECICLAJES RQJ	CLL 57 U SUR N 76 A - 70	7772021 3158526655	RESOLUCIÓN NO 00547 DEL 02/03/2018	SDA-07-2015-7922	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO Y TRATAMIENTO	ENVASES PLÁSTICOS (ISOTANQUES. IBC´S, GARRAFAS, CANECAS, GALONES, ECT) Y METÁLICOS IMPREGNADOS CON LOS SIGUIENTES RESPEL:
							Y41. SOLVENTES ORGÁNICOS HALOGENADOS Y42. DISOLVENTES ORGANICOS CON EXCLUSIÓN DE DISOLVENTES HALOGENADOS
							A4060. DESECHOS DE MEZCLAS Y EMULSIONES DE ACEITE Y AGUA O DE HIDROCARBUROS Y AGUA
							A3170. DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCION DE HIDROCARBUROS HALOGENADOS ALIFATICOS (CLOROMETANO, CLORURO DE VINILO, CLORURODE ALILO Y EPICLORIDINA)

							Y12. DESECHOS DE LA PRODUCCION, PREPARACIÓN Y UTILIZACIÓN DE TINTAS, COLORANTES, PIGMENTOS, PINTURAS, LACAS O BARINCES.
							Y13. DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN PREPARACION Y UTILIZACIÓN DE RESINAS, LÁTEX, PLASTIFICANTES O COLAS Y ADHESIVOS.
							A4030. DESECHOS RESULTANTES DE LA PRODUCCION PREPARACION Y UTILIZACION DE BIOCIDAS Y PRODUCTOS FARMACEUTICOS CON INCLUSIÓN DE LOS DESECHOS DE PLAGUICIDAS Y HERBICIDAS.
22	RECIPROIL	TV124 N 26 - 76/78	3403083 3403071	RESOLUCIÓN NO 1825 DEL 15/10/2006 MODIFICACIÓN RESOLUCIÓN NO 190 DEL 18/01/2011	DM-07-2005-1112	ALMACENAMIENTO Y APROVECHAMIENTO	ACEITES USADOS
						ALMACENAMIENTO	SOLIDOS IMPREGNADOS CON HIDROCARBUROS
						ALMACENAMIENTO TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN FINAL A TRAVES DE TERCEROS	FILTROS USADOS
23	SERVICIO GEOLOGICO COLOMBIANO SAS	AK 50 N 26 - 20	3242279	RESOLUCIÓN NO 3326 DEL 01/11/2007 RESOLUCIÓN NO 010 DEL 15/10/2008	DM-06-2006-2325 DM-05-2001-1624	ALMACENAMIENTO	FUENTES RADIOACTIVAS EN DESUSO
24	SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE SENA	KR 89 a No.64C- 45	5960050	RESOLUCIÓN NO 3565 DEL 13/11/2018	SDA-07-2014-1384	ALMACENAMIENTO, TRATAMIENTO, APROVECHAMIENTO (RECUPERACION)	GASES REFRIGERANTES TIPO CFC R12, R22, R- 134A, R-401A, R-401B, R-402A, R-402B, R-404A, R-407C, R-408A, R-409A, R-410A, R-410B, R-411A, R-411B, R-412A, R-414A, R-414B, R-416A, R-500, R-502.
25	SITEKOL REFINNING SAS	KR 106 N 15 A - 25 INT 3 MZ 5 BG 15 Y 17	5739976	RESOLUCIÓN No 03477 del 03/12/2019	SDA-07-2014-2219	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO	RESIDUOS DE TARJETAS DE CIRCUITO IMPRESO

26	TRATAR AMBIENTAL SAS	KR 80 N 16 D - 11	4383403	RESOLUCIÓN NO 2848 DEL 16/12/2015 CESIÓN RESOLUCIÓN NO 8650 DEL 03/12/2009 DE DOMINGUEZ SANCHEZ S.A.	SDA-07-2003-2006	ALMACENAMIENTO Y TRATAMIENTO	LODOS HIDROCARBURADOS - BORRAS- AGUAS HIDROCARBURADAS
27	WESTECH RECYCLERS OF LATIN AMERICA SAS	ACL 6 N 47 - 58 INT 1 PISO 1	7590770	RESOLUCIÓN NO 1705 DEL 30/09/2013	SDA-07-2013-35	ALMACENAMIENTO APROVECHAMIENTO Y DISPOSICIÓN FINAL A TRAVES DE TERCEROS	RESIDUOS DE APARATOS ELECTRICOS Y ELECTRÓNICOS -RAEE: PEQUEÑOS ELECTRODOMESTICOS, EQUIPOS INFORMÁTICOS Y DE TELECOMUNICACIONES, APARATOS ELECTRICOS DE CONSUMO, HERRAMIENTAS ELECTRICAS Y ELECTRÓNICAS, JUGUETES, EQUIPOS DEPORTIVOS Y DE TIEMPO LIBRE. METALICOS, OXIDOS E HIDROXIDOS DE ZINC, MANGANESO, CROMO III, COBRE Y OTROS METALES PESADOS, SALES Y SUSTANCIAS QUÍMICAS DEL PROCESO DE CURTIDO DE PIELES, SALES DE IMPREGNADO DE LA MADERA, SALES PARA ENDURECIMIENTO DEL ACERO, CLORUROS Y SULFUROS CON METALES PESADOS, SALES CON CONTENIDO NOCIVO DE CIANURO, CAL CON CONTENIDO DE ARSENICO, HIDROFLORURO DE AMONIO, RESIDUOS DE PLAGUICIDAS, RESIDUOS DE DESINFECTANTES, RESIDUOS DE LA INDUSTRIA FARMACEUTICA., PRODUCTOS FARMACEUTICOS CADUCOS, DETERGENTES, TENSOACTIVOS, RESIDUOS QUÍMICOS DE LABORATORIOS, GRASAS Y CERAS, RESIDUOS SÓLIDOS EMPAPADOS DE ACEITE Y GRASA, EMULSIONES BILUMINOSAS, LODOS CON COMBUSTIBLE, LODOS CON LUBRICANTES, RESIDUOS DE LA REFINACIÓN DE ACEITES USADOS, RESIDUOS DEL ALQUITRAN, LODOS CON SOLVENTES ORGANICOS HALOGENADOS, PINTURAS Y BARNICO RESIDUALES, LODOS DE PINTURAS Y BARNICES, RESIDUOS PLASTICOS NO ENDURECIDOS, ABLANDADORES

							HALOGENADOS, ABLANDADORES NO HALOGENADOS
NOTA:							
1. SE INFORMA A LOS INTERESADOS QUE LOS ACTOS ADMINISTRATIVOS (RESOLUCIONES Y AUTOS) RELACIONADOS EN LA PRESENTE TABLA, PUEDEN SER CONSULTADOS EN EL BOLETIN LEGAL DEL SERVICIO WEB DE LA SECRETARIA DISTRITAL DE AMBIENTE, INGRESANDO A TRAVES DE LA PAGINA www.ambientebogota.gov.co, EN EL VINCULO “BOLETIN LEGAL” O A TRAVES DEL ENLACE http://190.27.245.106/BLA/boletinlegal/index.php							
2. IGUALMENTE LOS EXPEDIENTES DE LAS SOCIEDADES RELACIONADA EN LA TABLA ANTERIOR, ANTERIOR, PUEDEN SER CONSULTADOS EN LAS VENTANILLAS DE ATENCIÓN AL USUARIO DE LA SECRETARIA DISTRITAL DE AMBIENTE UBICADA EN LA AVENIDA CARACAS N 54 - 38 EN JORNADA CONTINUA DE 8:00 AM - 5:00 PM							
3. EN EL ANEXO NO 1. SE PUEDE VERIFICAR LA CLASIFICACIÓN NFPA QUE SE CITA EN EL PRESENTE CUADRO							






ZOOLAB
Etiqueta de muestras Suelo-Vegetal-Agua
Fecha de muestreo:
17-03-2025.
Municipio/Departamento:
Mosquera Cundinamarca.
Finca:
Centro de Biotecnología A.
Cultivo/variedad:
Acacia decurrens.
Lote/Bloque:
Edad:
N/A.
Propietario:
CBA - SENA.
Responsable:
Claudia Herrera.
Información adicional

LA SUSCRITAS REPRESENTANTE LEGAL Y CONTADORA DE ZOOLAB SAS
NIT. 830.085.197-8

CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO

Las suscritas Sandra Liliana Cortes Avellaneda, identificada con cedula de ciudadanía, No 52.265.505 de Bogotá, y Paola Esperanza Gómez identificada con cedula de ciudadanía No 1.073.603.040 de Pacho, certifican bajo la gravedad del juramento que **ZOOLAB SAS**, con NIT 830.085.197-8, ha cumplido durante los seis (6) meses a la fecha de expedición de la presente certificación, con los pagos de seguridad social en salud, pensiones, riesgos laborales y con los aportes parafiscales correspondientes a sus empleados vinculados por contrato de trabajo.

La presente certificación se expide en Bogotá D.C., a los cinco (05) días del mes de mayo del año 2025



Sandra Liliana Cortes
Representante legal
CC: 52.265.505

Paola Esperanza Gómez
Contadora
TP 259881-T

compensar | miplanilla.com

PLANILLA INTEGRADA DE AUTOLIQUIDACION DE APORTES

DATOS DEL APORTANTE						
TIPO	NÚMERO	NOMBRE APORTANTE	DIRECCIÓN	TELÉFONO	CORREO	EXONERADO PAGO PARAFISCALES Y SALUD
NI	830085197-8	ZOOLAB SAS	CARRERA 73 NO. 53 - 04	2639874	contabilidad@zoolabcolombia.com	
FORMA PRESENTACIÓN	CLASE APORTANTE	NOMBRE SUCURSAL / CÓDIGO	DEPARTAMENTO	CIUDAD / MUNICIPIO		
ÚNICA	B – menos de 200 c		BOGOTÁ D. C.	BOGOTÁ, D.C.		SI

DATOS DE LA PLANILLA						
PLANILLA ASOCIADA	FECHA PAGO ASOCIADA (DIA/MES/AÑO)	TIPO PLANILLA	FECHA PAGO (DIA/MES/AÑO)	NÚMERO PLANILLA	CANTIDAD	
					EMPLEADOS	UPC
					3	0
PERIODO SALUD	PERIODO PENSIONES				TOTAL A PAGAR	
2025-04	2025-03	E	22/04/2025	85711338	$1.897.200	

TOTALES POR SUBSISTEMAS

TOTALES SALUD

Código EPS	Nombre	NIT	Cotización Obligatoria	UPC Adicional	Incapacidades		Licencia Maternidad		Días Mora	Valor Mora Cotización	Valor Mora UPC	Total a Pagar	No. Afiliados
					No. Autorización	Valor	No. Autorización	Valor					
EPS008	Compensar EPS	860066942-7	189.900	0		0		0	0	0	0	189.900	2
EPS010	EPS Sura	800088702-2	113.200	0		0		0	0	0	0	113.200	1

TOTALES PENSIÓN

Código AFP	Nombre	NIT	Cotización Obligatoria	Aporte Voluntario Afiliado	Aporte Voluntario Aportante	Aporte FSP - Solidaridad	Aporte FSP - Subsistencia	Días Mora	Valor Mora Cotización	Valor Mora FSP	Total a Pagar	No. Afiliados
230201	Proteccion (ING + Proteccion)	800229739-0	452.500	0	0	0	0	0	0		452.500	1
230301	Porvenir	800224808-8	306.700	0	0	0	0	0	0		306.700	1
25-14	Colpensiones	900336004-7	452.500	0	0	0	0	0	0		452.500	1

TOTALES RIESGOS LABORALES

Código ARL	Nombre	NIT	Cotización Obligatoria	Incapacidades		Aportes Otros Sistemas	Valor Neto Cotización	Días Mora	Valor Mora Cotización	Subtotal Cotización	No. Radicado Saldo a Favor	Valor Saldo a Favor	Fondo Solidaridad	Total a Pagar	No. Afiliados
				No. Autorización	Valor										
14-11	ARL SURA	890903790-5	79.300				79.300	0	0	79.300			793	79.300	3

TOTALES CAJAS

Código CCF	Nombre	NIT	Valor Aporte	Días Mora	Valor Mora Aporte	Total a Pagar	No. Afiliados
CCF22	Colsubsidio	860007336-1	303.100	0	0	303.100	3

TOTALES PARAFISCALES

Valor Aporte	Días Mora	Valor Mora Aporte	Total a Pagar	No. Afiliados
SENA				
0	0	0	0	0
ICBF				
0	0	0	0	0
ESAP				
MEN				

TOTALES POR SUBSISTEMA

Tipo Administradora	No. Administradoras Reportadas	Valor antes de IGE, LMA, IRP y Mora	Total a Pagar
Salud	2	303.100	303.100
Pensión	3	1.211.700	1.211.700
Riesgos Laborales	1	79.300	79.300
CCF	1	303.100	303.100
ESAP	0	0	0
ICBF	0	0	0
MEN	0	0	0
SENA	0	0	0
TOTALES	7	1.897.200	1.897.200

PAGADA

Este documento está clasificado como PRIVADO por parte de Compensar Operador de Información

compensar | miplanilla.com

PLANILLA INTEGRADA DE AUTOLIQUIDACION DE APORTES

DATOS DEL APORTANTE						
TIPO	NÚMERO	NOMBRE APORTANTE		DIRECCIÓN	TELÉFONO	CORREO
NI	830085197-8	ZOOLAB SAS		CARRERA 73 NO. 53 - 04	2639874	contabilidad@zoolabcolombia.com
FORMA PRESENTACIÓN	CLASE APORTANTE	NOMBRE SUCURSAL	CÓDIGO	DEPARTAMENTO	CIUDAD / MUNICIPIO	EXONERADO PAGO PARAFISCALES Y SALUD
ÚNICA	B – menos de 200 c			BOGOTÁ D. C.	BOGOTÁ, D.C.	SI

DATOS DE LA PLANILLA						
PLANILLA ASOCIADA	FECHA PAGO ASOCIADA (DIA/MES/AÑO)	TIPO PLANILLA	FECHA PAGO (DIA/MES/AÑO)	NÚMERO PLANILLA	CANTIDAD	
					EMPLEADOS	UPC
					3	0
PERIODO SALUD	PERIODO PENSIONES				TOTAL A PAGAR	
2025-04	2025-03	E	22/04/2025	85711338	$1.897.200	

DETALLE POR COTIZANTE

INFORMACIÓN COTIZANTE									INFORMACIÓN NOVEDADES																PENSIÓN							SALUD			RIESGOS LABORALES				CCF			PARAFISCALES				
No.	Tipo	No. de Identificación	Apellidos y Nombres	Cotizante	Subtipo	Extranjero	Colom. exterior	Exonerado	ING	RET	TDE	TAE	TDP	TAP	VSP	VST	SLN	IGE	LMA	VAC	AVP	VCT	IRL	CORRECCIÓN	Cód. AFP	IBC AFP	Cotización	Voluntario Afiliado	Voluntario Aportante	Fondo pensional de solidaridad	Fondo pensional de subsistencia	Cód. EPS	IBC EPS	Cotización / Valor UPC	Cód. ARL	IBC ARL	Clase de Riesgo	Cotización	Código CCF	IBC CCF	Aporte CCF	IBC otros parafiscales	Aporte SENA	Aporte ICBF	Aporte ESAP	Aporte MEN
1	CC	1014183860	MORENO CASTAÑEDA JAVIER ALEXANDER	1	0			S																	230201	2.828.082	452.500	0	0	0	0	EPS008	2.828.082	113.200	14-11	2.828.082	2	29.600	CCF22	2.828.082	113.200	0	0	0	0	0
2	CC	1020751152	SALINAS ALDANA ELIANA PAOLA	1	0			S																	25-14	2.828.082	452.500	0	0	0	0	EPS010	2.828.082	113.200	14-11	2.828.082	2	29.600	CCF22	2.828.082	113.200	0	0	0	0	0
3	CC	52230604	QUINTERO GARCIA SANDRA JULIETH	1	0			S																	230301	1.916.477	306.700	0	0	0	0	EPS008	1.916.477	76.700	14-11	1.916.477	2	20.100	CCF22	1.916.477	76.700	0	0	0	0	0

PAGADA

Este documento está clasificado como PRIVADO por parte de Compensar Operador de Información

SENA REGIONAL CUNDINAMARCA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA AGROPECUARIA

CONTRATO No CO1.PCCNTR.6998654 de 2024
CONTRATISTA ZOOLAB S.A.S.
NIT. 830085197-8

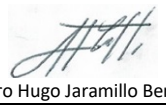
REGISTRO PRESUPUESTAL No. **365724**

VALOR CONTRATO $ 40.000.000

PERIODO	VALOR A PAGAR	SALDO CONTRATO
DIC-2024	$ 14.705.600,00	$ 25.294.400,00
DIC-2025	$ 10.819.146,00	$ 14.475.254,00
	$ 25.524.746,00	64%

Fecha: 2 DE MAYO 2025

Firma de Supervisor Encargado



Álvaro Hugo Jaramillo Benavides

	Versión: 07
	Código: GIL-F-010

Proceso Gestión de Infraestructura y Logística

Formato Acta de Recibo a Satisfacción

		Acta N°	**2**
FECHA:	**2 DE MAYO 2025**	**CIUDAD/MUNICIPIO:**	**Mosquera**
COD REGIONAL:	**25**	**REGIONAL**	**CUNDINAMARCA**
CENTRO DE COSTO:	**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA AGROPECUARIA**		
COD CENTRO DE COSTO:	**951210**		
TIPO DE ADQUISICIÓN:	**CONTRATO**	**TIPO DE ENTREGA:**	**SUMINISTRO**
N° DE ACTO ADMINISTRATIVO:	**MC-CMC-CBA-0019-2024_1**	**FECHA ACTO ADMINISTRATIVO:**	
RUBRO PRESUPUESTAL	**951210-C-3603-1300-15-20305C-3603025-02**		
PROVEEDOR CONTRATISTA:	**ZOOLAB S.A.S**		
NIT/CEDULA DE CIUDADANIA:	**830085197-8**		
VALOR TOTAL:	**14.705.600**		
FECHA DE VENCIMIENTO:	**16/12/2024**		
OBJETO DEL CONTRATO:	"PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS, VACUNAS, ANÁLISIS QUÍMICOS DE ESPECIES ANIMALES Y ANÁLISIS BROMATOLÓGICO- ESPECIALIZADOS PARA EL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA SENA- MOSQUERA"		

CANTIDAD BIENES DEVOLUTIVOS _____ **CANTIDAD BIENES DE CONSUMO** **2**

RECIBIDO A SATISFACCION:

A través del siguiente documento certifico que los bienes recibidos cumplen con las características técnicas y físicas establecidas por el SENA en el acto administrativo.

OBSERVACIONES	**RECIBIDAS A SATISFACCIÓN 1 MUESTRAS 2 ANALISIS BROMATOLOGICOS, CON EL NUMERO DE FACTURA 1ZB No 70202 POR UN VALOR DE $ 10,819,146**
	EL PEDIDO SOLICITADO SE RECIBIO ASATISFACCION CON LOS ESTUDIOS SOLICITADOS DE ACUERDO A LO ESTIPULADO EN LAS FICHAS TECNICAS

FIRMA SUPERVISOR			
NOMBRE COMPLETO	**ALVARO HUGO JARAMILLO**		
N° DE IDENTIFICACIÓN	**19.448.397**		
CORREO INSTITUCIONAL	ahjaramillo@sena.edu.co		
CARGO	**INSTRUCTOR-G20**	**N° DE CONTACTO**	**3115685786**

Factura Electrónica De Venta No

1ZB No. 70202

Documento Oficial de Autorización de Numeración Facturación Electrónica No. 18764090542482 que habilita desde 1ZB 70072 hasta 1ZB 100000. Vence 2026-03-15

IVA Regimen Común No somos Retenedores de Renta ni de IVA
Actividad Económica ICA 7120 9.66 X 1000
No somos Grandes Contribuyentes

ZOOLAB SAS

Nit 830085197 8

CLIENTE	SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE SENA
NIT	899999034 1

DIRECCIÓN	CIUDAD	TELÉFONO
CL 57 8 69	Bogota D.C.	6015461500

POR CONCEPTO DE

#$36-02-00-025-951210; Contrato 6998654 #XX; nahjaramillo@sena.edu.co#$ MUESTRAS PROCESADAS SEGÚN CONTRATO No CO1.PCCNTR.6998654

FECHA FACTURA	FECHA VENCIMIENTO	VENDEDOR	FORMA DE PAGO
02/05/2025	02/05/2025	SANDRA LILIANA CORTES AVELLANEDA	Credito

Código	Descripción	Item	Cant.	U Medida	Valor Unitario	IVA	Valor IVA	Total
0148	CREATINA-FOSFOCINASA TOTAL (CPK TOTAL) - EXCLUIDA	1	10	Und.	40.150	0%	0	401.500
0327	ANÁLISIS BROMATOLÓGICO PROXIMAL ESPECIAL DE PASTOS	2	28	Und.	392.250	0%	0	10.983.000

Total líneas o ítems: 2

Valor en Letras

DIEZ MILLONES OCHOCIENTOS DIECINUEVE MIL CIENTO CUARENTA Y SEIS PESOS M/CTE

SUBTOTAL	**11.384.500**
DESCUENTO	**0**
IVA	**0**
RETEFUENTE	**455.380**
RETEIVA	**0**
RETEICA	**109.974**
TOTAL FACTURA	**10.819.146**

FAVOR CONSIGNAR EN BANCOLOMBIA CUENTA DE AHORROS 58979026950 - enviar soporte a contabilidad@zoolabcolombia.com



Representación Gráfica de la Factura de Venta Electrónica

Fecha y Hora de Generación: 02/05/2025 16:

CR 73 53 04 Teléfono 2639874 Bogota D.C.
Correo Electrónico contabilidad@zoolabcolombia.com

Fabricante y Proveedor Tecnológico: World Office Colombia SAS NIT 900534356-3 Software: World Office (wo_2)
CUFE: a50f79df1c14a49b99c08f4f7ea54e32d977bdee28fd6bc3a10d6c0a66a5826855b2b9b6b0385729743e205df8b8c2b4 --Fecha y Hora de Expedición : 02/05/2025 4:17:26 p. m.

Componente del Sistema Gestión y Autocontrol SIGA

Verificación de obligaciones contractuales

El Sistema Integrado de Gestión y Autocontrol del **Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA),** aprobada por el Consejo Directivo Nacional mediante Acuerdo 004 de 2021 y por Comité institucional de Gestión y Desempeño del servicio nacional de aprendizaje, establece la actualización de los elementos estructurales del SIGA, los cuales se encuentran actualizados y publicados en la plataforma CompromISO.

En concordancia con esto y dada la importancia del componente Ambiental y de Seguridad y Salud en el trabajo, con relación a la ejecución del proceso contractual **CO1.PCCNTR.6998654 de 2024** cuyo objeto es "**PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS, VACUNAS, ANÁLISIS QUÍMICOS DE ESPECIES ANIMALES Y ANÁLISIS BROMATOLÓGICO- ESPECIALIZADOS PARA EL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA SENA- MOSQUERA.**"

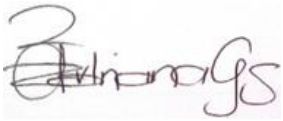
Se hace necesario que, en la etapa contractual, se atiendan las condiciones contempladas en el estudio previo y en los requisitos SIGA, en cumplimiento de la normativa existente sobre estas temáticas, para ello, el equipo SIGA hace verificación del cumplimiento de estas únicamente en materia ambiental y SST y las evidencias que lo soportan cargadas en el aplicativo SECOP 2 en el informe de Gestión Contractual del proceso en mención.

Una vez corroborada esta información se evidencia el **cumplimiento a las obligaciones relacionadas** durante la ejecución del contrato a la fecha.

Se firma en Mosquera, a los 16 días del mes de junio del 2025



Diana Mercedes Hernández
Profesional en SST



Astrid Adriana González
Dinamizadora Ambiental y Energética