

**APENDICE A**

**INSTRUCTIVO DEL ESTUCHE COMERCIAL PARA LA  
DETECCIÓN SEROLÓGICA DE *Neospora caninum* MEDIANTE  
LA TÉCNICA DE ELISA.**

La técnica para la utilización del estuche comercial y la preparación de reactivos se describieron en la sección de material y Métodos. En este apéndice se describen los reactivos utilizados, material y equipo necesario que no se suministran en el estuche, se explican precauciones y advertencias para los usuarios, preparación del lector de ELISA, interpretación de los resultados y cálculos.

**REACTIVOS**

- A. Placas recubiertas con antígeno de *Neospora*. 2
- B. Conjugado anti-bovino: HRPO. 30ml
- C. Control positivo de *Neospora*. Anti-*Neospora* bovino en tampón con estabilizadores proteicos. Con azida de sodio como conservante. 3ml
- D. Control negativo de *Neospora*. Suero bovino no reactivo frente a *Neospora* en tampón fosfato con estabilizadores proteicos. Con azida de sodio como conservante. 3ml
- E. Diluyente para la muestra. Tampones con estabilizadores proteicos. Con azida de sodio como conservante. 235ml
- F. Concentrado para lavado. Lavado de fosfato/Tween 10x.5 contiene gentamicina como conservante. 235ml

- G. Substrato TMB 60ml
- H. Solución de interrupción 60ml

### **MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO QUE NO SE SUMINISTRAN**

- A. Pipetas de precisión para dispensar 0.005, 0.100 y 0.500 $\mu$ l, o dispositivos para pipeteado múltiple.
- B. Puntas de pipeta desechables.
- C. Probeta graduada de 500ml para la solución de lavado.
- D. Lector para placas de 96 pozos.
- E. Tubos de plástico o vidrio para diluir las muestras.
- F. Agua destilada o deionizada.
- G. Dispositivo para dispensar y aspirar la solución de lavado.
- H. Una fuente de vacío y un recipiente para recoger la solución aspirada.

### **PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS PARA LOS USUARIOS**

- A. Trate todos los materiales biológicos de *Neospora* como si fueran capaces de transmitir *Neospora*.
- B. No use la boca para pipetear.
- C. No coma, beba ni fume en los lugares donde se esté trabajando con las muestras o con los reactivos del kit.
- D. El substrato de TMB y las soluciones de interrupción pueden causar irritaciones en la piel.

- E. Algunos componentes del kit contienen azida de sodio como conservante. Evite la contaminación del conjugado anti-bovino: HRPO con éste conservante.
- F. No exponga la solución TMB a luz fuerte ni a agentes oxidantes. Utilice envases limpios de plástico o de vidrio siempre que use la solución de substrato TMB.
- G. Almacene los reactivos entre 2° y 7° c. Deje que alcancen la temperatura ambiente antes de usarlos y vuelva a almacenarlos entre 2° y 7° c después de usarlos.
- H. Todos los desechos deben de desinfectarse correctamente antes de eliminarse.
- I. Evite la contaminación de los componentes del kit.
- J. No use componentes caducados, ni mezcle componentes con números de serie diferentes.
- K. Se obtendrán resultados óptimos si sigue éste protocolo estrictamente. Para mantener la precisión y exactitud, es necesario efectuar el pipeteado, la toma de tiempo y el lavado cuidadosamente en todo éste procedimiento

## PREPARACIÓN DEL LECTOR DE ELISA

- A. Colocar la densidad óptica (D.O.) de longitud de lectura a 620nm.
- B. Registrar los controles negativos en las casillas A1 A2
- C. Registrar los controles positivos en las casillas A3 A4
- D. Iniciar la maquina para leer la placa.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- A. Para que el ensayo sea válido, la diferencia (P-N) entre el promedio (media) del control positivo (PC), y el promedio del control negativo (NC) tiene que ser mayor o igual que 0.150. además , el NC debe ser menor o igual que 0.20.
- B. La presencia o ausencia de anticuerpo contra *Neospora* se determina al calcular el cociente de muestra con respecto al control positivo (S/P) para cada muestra. El control positivo se ha normalizado y representa una cantidad considerable de anticuerpo contra *Neospora* en suero bovino.
- C. La muestra de suero con cocientes S/P menores que 0.50 se clasifican como negativas hacia los anticuerpos contra *Neospora*.
- D. Si el cociente S/P es mayor o igual que 0.50, las muestras se clasifican como positivas hacia los anticuerpos contra *Neospora*.

## CÁLCULOS

A. Cálculo del promedio del control negativo (NC).

$$NC = A1 A(650) + A2 A(650) + 2$$

$$\text{Ejemplo: } 0.080 + 0.090 + 2 = 0.085$$

B. Cálculo del promedio del control positivo (PC).

$$PC = A3 A(650) + A4 A(650) + 2$$

$$\text{Ejemplo} = 0.510 + 0.500 + 2 = 0.505$$

C. Cálculo del cociente (S/P)

$$S/P = \text{Muestra } A(650) - NC + PC - NC$$

$$\text{Ejemplo: Promedio de la muestra} = 0.450$$

$$S/P = 0.450 - 0.085 + 0.505 - 0.085 = 0.365 + 0.420 = 0.87$$

**APÉNDICE B**

**INSTRUCTIVO DEL ESTUCHE COMERCIAL PARA LA  
DETECCIÓN SEROLÓGICA DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS  
BOVINA MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA.**

La técnica para la utilización del estuche comercial y la preparación de los reactivos se describieron en la sección de material y métodos. En éste apéndice se describen los reactivos utilizados, material y equipo necesario que no se suministran en el estuche, se explican precauciones y advertencias para los usuarios, preparación del lector de ELISA, interpretación de los resultados y cálculos.

**REACTIVOS**

- A. Placas recubiertas con antígeno del VLB. 2
- B. Control positivo. 3.6 ml listo para usar
- C. Control negativo. 3.6 ml listo para usar
- D. Conjugado 100X Anticuerpo-Peroxidasa. 150 $\mu$ l
- E. Diluyente para el conjugado. 14ml listo para usar
- F. Diluyente para la muestra. 30ml listo para usar
- G. Solución substrato. 20ml listo para usar
- H. Solución de interrupción. 20ml lista para usar
- I. Solución concentrado para lavado10x. 120ml

## **MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO QUE NO SE SUMINISTRAN**

- A. Pipetas de volumen ajustable. 5 $\mu$ l-1000 $\mu$ l
- B. Micropipetas de 8 o 12 canales de 50 $\mu$ l.
- C. Puntillas de pipetas desechables.
- D. Tubos de plástico o vidrio para diluir las muestras.
- E. Lector para placas de 96 pozos ELISA.
- F. Agua deionizada o destilada.
- G. Toallas de papel.
- H. Papel aluminio.
- I. Recipientes de pipetas
- J. Probetas graduadas para mezclar el conjugado Anticuerpo-Peroxidasa y la solución de lavado.
- K. Dispositivo para dispensar y aspirar la solución de lavado.
- L. Una fuente de vacío y un recipiente para recoger la solución aspirada.
- M. Pipetas de 1ml, 5ml y 10ml.
- N. Reloj de laboratorio.
- O. Tijeras.
- P. Lápiz o pluma y marcador de laboratorio.

## **PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS PARA LOS USUARIOS**

- A. No coma, beba ni fume en los lugares donde se esté trabajando con las muestras o con los reactivos del kit.
- B. No use reactivos contaminados, caducados o de otro número serie.
- C. No use la boca para pipetear.
- D. Algunos reactivos contienen azida de sodio, Timerosal y fluoruro de sodio. evite ingerirlos ya que pueden ser tóxicos y nocivos para la salud. En caso de que esto ocurra busque atención médica.
- E. Controles positivos y negativos deben usarse cada vez que una prueba es llevada a cabo.
- F. Use la solución de lavado diluida 1x en ambos pasos de lavado.

## **PREPARACIÓN DEL LECTOR DE ELISA**

- E. Colocar la densidad óptica (D.O.) de longitud de lectura a 620nm.
- F. Registrar los controles positivos en las casillas A1 A2
- G. Registrar los controles negativos en las casillas A3 A4
- H. Iniciar la maquina para leer la placa.



## **INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS Y CÁLCULOS**

A. Para que el ensayo sea valido el control positivo debe producir una D.O. media mayor o igual a 0.250 y menor que 2.00. El control negativo debe producir una D.O. media menor a 0.200.

B. Positivo.- Cualquier prueba produciendo una D.O. mayor o igual a la media del control positivo es positivo hacia los anticuerpos contra VLB.

C. Negativo.- Cualquier prueba produciendo una D.O. menor que la media del control positivo es negativa hacia los anticuerpos contra VLB.

## APÉNDICE C

### INSTRUCTIVO PARA EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS POR EL MÉTODO DE TARJETA O ROSA DE BENGALA.

El procedimiento de la prueba de tarjeta o rosa de bengala se describió en la sección de material y métodos. En éste apéndice se describen los reactivos utilizados, material y equipo necesario para la prueba, se explican precauciones y advertencias para los usuarios e interpretación de los resultados.

#### REACTIVOS

##### A. Antígeno para la prueba de tarjeta.

Antígeno autorizado por la SAGAR elaborado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) a base de *Brucella abortus* cepa 1119-3, teñido con rosa de bengala en ácido láctico, con un PH de 3.65 ( $\pm$  0.05) y con una concentración celular del 8%.

## **MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO PARA LA PRUEBA**

- A. Gradillas
- B. Micropipetas de volumen variable de 10 a 100 $\mu$ l.
- C. Tubos de ensayo de diferentes tamaños.
- D. Pipeta serológica de 1ml.
- E. Pipeta serológica de 5ml.
- F. Pipeta serológica de 10ml.
- G. Puntillas para micropipeta
- H. Placa de vidrio del tamaño del aglutinoscopio con cuadrícula de 3 x 3 cm.
- I. Palillos de madera o mano metálica.
- J. Congelador (-20°C).
- K. Refrigerador.
- L. Centrifuga.
- M. Reloj marcador.
- N. Aglutinoscopio.

## **PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS PARA LOS USUARIOS**

- A. La muestra deberá ser suero no hemolizado.
- B. El antígeno deberá usarse siempre a temperatura ambiente.
- C. El antígeno puede deteriorarse si se deja a temperatura ambiente por un tiempo prolongado.
- D. Nunca se debe congelar el antígeno ya que se rompe la suspensión.

## **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

- A. Positivo.- Presencia de cualquier grado de aglutinación.**
- B. Negativo.- No se observa aglutinación.**