

Prueba de anticuerpos de tuberculosis bovina Enferplex

01117 (460 pruebas)

Prueba para la detección *in vitro* de anticuerpos contra *Mycobacterium bovis*
en suero y, provisionalmente, leche

Solo para uso de diagnóstico veterinario *in vitro*

Fabricada y distribuida por:
Enfer Scientific,
Unit T, M7 Business Park,
Newhall, Naas,
Co. Kildare.
Irlanda
Tel.: +353 459 83800



Organización Mundial
de Sanidad Animal
Fundada como OIE

Validada y certificada por la OMSA como apta para los propósitos definidos en este documento. Número de registro de la OMSA: 20190113

Índice

1.0	Información general.....	3
2.0	Uso previsto	3
3.0	Principio del procedimiento	4
4.0	Reactivos	4
5.0	Materiales y equipamiento necesarios pero no suministrados.....	4
6.0	Advertencias y precauciones	5
7.0	Información sobre salud y seguridad	5
8.0	Preparación de reactivos	6
9.0	Preparación de las muestras y los controles	6
10.0	Protocolo de la prueba	7
11.0	Resultados.....	7
12.0	Limitaciones del procedimiento.....	8
13.0	Disposición recomendada de la placa	8

1.0 Información general

La tuberculosis bovina es provocada por el patógeno *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) y se trata de una zoonosis grave. Esta enfermedad se identificó en primer lugar en animales domésticos, aunque hay muchos huéspedes posibles, incluidos la mayoría de los mamíferos. Además del ganado y los ungulados salvajes, se han registrado casos en elefantes, primates no humanos y muchas otras especies (1). Aparte de a los mecanismos patogénicos, la capacidad de *M. bovis* de infectar a una variedad tan amplia de especies puede atribuirse a las diferentes vías por las que se puede transmitir de un animal a otro y que han provocado que se convierta en una enfermedad endémica en muchos países (2, 3).

2.0 Uso previsto

Certificada por la OIE en mayo de 2019 como apta para la detección de anticuerpos contra *Mycobacterium bovis* en muestras de suero bovino, para el uso como prueba auxiliar en combinación con otros métodos de estudio de prevalencia serológica o diagnóstico y tratamiento de infecciones por *M. bovis* en rebaños para los fines siguientes:

1. Confirmar, pero no descartar, diagnósticos de casos clínicos o casos sospechados, incluida la confirmación de pruebas de detección positivas tanto en animales individuales como en rebaños con una prevalencia de infección de muy baja a alta, basándose en la detección de anticuerpos en suero bovino.
2. Detectar animales infectados por *M. bovis* que no han dado positivo en la prueba comparativa de la tuberculina intradérmica cervical simple (SICCT) o en el ensayo de liberación de interferón-gamma (IFN γ), basándose en la detección de anticuerpos en suero bovino.
3. Confirmar, pero no descartar, infecciones en animales con reacciones no concluyentes en la prueba SICCT, basándose en la detección de anticuerpos en suero bovino.
4. Como prueba de cribado para identificar los animales con la mayor probabilidad de tener lesiones visibles al marcar el número de antígenos de *M. bovis* identificados en animales seropositivos con tuberculosis bovina.

Certificada por la OIE en mayo de 2022 como apta para la detección de anticuerpos contra *Mycobacterium bovis* en muestras de leche bovina, para el uso como prueba auxiliar en combinación con otros métodos de estudio de prevalencia serológica o diagnóstico y tratamiento de infecciones por *M. bovis* en rebaños para los fines siguientes:

1. Confirmar, pero no descartar, diagnósticos de casos clínicos o casos sospechados, incluyendo la confirmación de pruebas de detección positivas tanto en animales individuales como en rebaños infectados, basándose en la detección de anticuerpos en muestras individuales de leche bovina, excluyendo el calostro y las muestras de leche tomadas durante los 4 primeros días tras el parto.
2. Como prueba de cribado para identificar rebaños infectados de *M. bovis*, basándose en la detección de anticuerpos en muestras de leche bovina del depósito, excluyendo el calostro y las muestras de leche tomadas durante los 4 primeros días tras el parto.

Especie y ejemplares:

Esta prueba ha sido validada y aprobada para muestras de suero bovino, tal y como se ha indicado anteriormente. Con relación al uso previsto en el punto 4 anteriormente descrito, durante los primeros cinco años a partir del registro se precisarán datos adicionales para cualificar y categorizar mejor la relación entre el número de antígenos de *M. bovis* y la probabilidad de lesiones visibles. Esta prueba también cuenta también con una aprobación provisional para analizar muestras de leche bovina como prueba de cribado del rebaño o como prueba suplementaria de confirmación en animales individuales, cuando se use en combinación con otros métodos para el diagnóstico y tratamiento de la infección por *M. bovis*.

3.0 Principio del procedimiento

La prueba de anticuerpos de tuberculosis bovina de Enferplex es un inmunoensayo enzimático cualitativo basado en la adición secuencial de suero o leche bovinos en una placa revestida de varios antígenos, un conjugado anticuerpo-enzima y un sustrato quimioluminiscente. Al incubar la muestra de prueba en el pocillo revestido de antígenos, se ven anticuerpos específicos de *M. bovis* en complejos con los antígenos inmovilizados. A este paso le sigue un lavado con solución de tampón de lavado 1X e inmunoglobulinas anti-IgG bovinas de oveja radiomarcadas con HRP (peroxidasa de rábano), donde se forma un complejo peroxidasa-conjugado-antígeno-anticuerpo. A continuación, el conjugado libre se lava, se usa un sustrato quimioluminiscente para generar la señal y se captura la imagen. Dicha imagen se analiza y los datos se reducen para determinar el estado de la muestra en la imagen macro de tuberculosis bovina de Enferplex.

4.0 Reactivos

El pack de reactivos 01117 contiene material suficiente para 460 pruebas y debe almacenarse a 2-8 °C. Preste atención a las condiciones de almacenamiento de cada uno de los componentes.

Contenido del kit	Cantidad y condiciones de almacenamiento
Placa de captación de anticuerpos TBB Placas de microtitulación (96 pocillos) revestidas con antígenos específicos para <i>Mycobacterium bovis</i>	5 x 96 pocillos 2-8 °C (en bolsas selladas en papel de aluminio)
Tampón de lavado 20X Concentrado 20X	1 x 500 ml 2-8 °C
Diluyente de muestra BMD Listo para usar	2 x 500 ml 2-8 °C
Diluyente de conjugado BMD Listo para usar	1 x 500 ml 2-8 °C
Conjugado de concentrado bovino Sin diluir	1 x 0,1 ml 2-8 °C
Multi-Lite A Sustrato quimioluminiscente para peroxidasa cuando se combina con Multi-Lite B	1 x 15 ml Temperatura ambiente (de +15 a 25 °C)
Multi-Lite B Sustrato quimioluminiscente para peroxidasa cuando se combina con Multi-Lite A	1 x 15 ml Temperatura ambiente (de +15 a 25 °C)
Control negativo TBB Suero bovino sin diluir negativo con conservante	1 x 0,1 ml -20 °C
Control positivo TBB Suero bovino sin diluir con conservante	1 x 0,1 ml -20 °C

5.0 Materiales y equipamiento necesarios pero no suministrados

- Incubadora/agitador de microplacas, termorregulado a 37 °C ± 2 °C y con capacidad de agitación de 900 rpm;
- generador de imágenes Q-View de Quansys Biosciences o equivalente;
- dispositivo para la aplicación y aspiración de la solución de lavado;
- agua desionizada, destilada o producto de ósmosis inversa de alta calidad;
- sellos de cubierta de microplaca y bandejas de dispensación de reactivo;
- micropipetas de precisión de canal único y multicanal de volumen apropiado y puntas desechables;
- recipientes de cristal o polipropileno para la dilución del conjugado de concentrado y otros reactivos;
- tubos/placas de polipropileno para la dilución de la muestra.

6.0 Advertencias y precauciones

- 6.1 Siga las instrucciones y no modifique el procedimiento de prueba ni use reactivos sustitutivos de otros fabricantes. No utilice los reactivos si ha pasado la fecha de caducidad y no mezcle componentes de distintos lotes.
- 6.2 Consulte la ficha de datos de seguridad del fabricante y el etiquetado del producto para obtener información sobre componentes potencialmente peligrosos.
- 6.3 Utilice una nueva punta de pipeta para cada muestra.
- 6.4 Espere a que los reactivos se ajusten a la temperatura ambiente (TA), (de +15 °C a 25 °C). Inmediatamente después de cada uso, vuelva a poner todos los reactivos en sus condiciones de almacenamiento adecuadas.
- 6.5 Evite la contaminación cruzada de solución Multi-Lite con la solución diluida de conjugado. No vuelva a introducir la solución Multi-Lite que no haya usado en la botella de Multi-Lite.
- 6.6 No deje las placas durante más de 3 minutos entre los lavados y la adición de reactivos.
- 6.7 No esponga la solución de sustrato a luces fuertes ni a agentes oxidantes.
- 6.8 Todos los reactivos se deben preparar en botellas limpias de cristal o de polipropileno. Hay que tener cuidado para que no haya contaminación cruzada de los reactivos. Utilice una bandeja dispensadora diferente para cada reactivo.
- 6.9 Todos los materiales biológicos sin utilizar se deben desechar siguiendo las normativas locales, regionales y nacionales.

7.0 Información sobre salud y seguridad

El tampón de lavado 20X del control de positivos y negativos TBB debe manejarse con cuidado. Preste atención a los riesgos identificados en las etiquetas de los recipientes individuales. El tampón de lavado 20X del control de positivos y negativos TBB contiene 2-metil-2H-isotiazol-3-ona, que está clasificado según la Directiva CE N.º 1272/2008 (relativa a la piel). Sensibilidad 1 – H317. Las siguientes son las declaraciones de peligro (H) y de precaución (P) apropiadas.



H317 Puede provocar reacciones alérgicas en la piel.
P261 Evite respirar polvo/humo/gas/nebulización/vapores/espray.
P272 No se permite el uso de ropa de trabajo contaminada fuera del lugar de trabajo.
P302 y P352 SI ENTRA EN CONTACTO CON LA PIEL: lave con abundante agua y jabón
P321 Tratamiento específico (véase esta etiqueta).
P333 y P313 Si se produce irritación en la piel o erupciones cutáneas: consulte a un médico.
P363 Lave toda la ropa contaminada antes de volver a usarla.

El diluyente de muestras BMD y el diluyente de conjugado BMD deben manejarse con cuidado. Preste atención a los riesgos identificados en las etiquetas de los recipientes individuales. El diluyente de muestra BMD y el diluyente de conjugado BMD contienen suero de cabra donante, que está clasificado según la Directiva CE N.º 1272/2008 [CLP] Resp. Sens. 1 H334. Las siguientes son las declaraciones de peligro (H) y de precaución (P) apropiadas.



H334 - Puede causar alergia, síntomas de asma o dificultades respiratorias si se inhala.

Advertencias (CLP)

P261 - Evite respirar vapores, nebulizaciones o spray.

P272 - No se permite el uso de ropa de trabajo contaminada fuera del lugar de trabajo.

P280 - Lleve guantes protectores, ropa de seguridad y gafas protectoras.

P284 - [En caso de ventilación inadecuada] lleve protección respiratoria.

P302 + P352 - SI ENTRA EN CONTACTO CON LA PIEL: lave con abundante agua.

P304 + P340 - SI SE INHALA: lleve a la persona a un lugar con aire fresco y manténgala en una postura en la que le sea fácil respirar.

P321 - Tratamiento específico (véase la sección 4 de esta ficha).

P333 + P313 - Si se produce irritación en la piel o erupciones cutáneas: consulte a un médico.
 P342 + P311 - Si se producen síntomas respiratorios: llame a un médico o a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA.
 P362 + P364 - Quítese la ropa contaminada y lávela antes de volver a usarla.
 P501 - Deseche los recipientes y sus contenidos en un punto de recogida de productos peligrosos o especiales, siguiendo las normativas locales, regionales, nacionales o internacionales.
 Las fichas de datos de seguridad están disponibles bajo petición.

8.0 Preparación de reactivos

Componente	Almacenamiento de componentes preparados
Potencia del tampón de lavado (1X) 1. Diluya el tampón de lavado 20X, 1/20 en agua desionizada. Prepare 500 ml por placa añadiendo 25 ml de tampón de lavado 20X a 475 ml de agua desionizada y mézclelo bien.	1 mes a TA (de +15 a 25 °C) o a 2-8 °C.
Potencia del conjugado para el ensayo con suero y leche 1. Prepare solo el volumen necesario para el número de pruebas que va a hacer. 2. Diluya el conjugado del concentrado bovino en diluyente de conjugado BMD con una proporción de 1:20000. Mezcle por inversión. 3. Por ejemplo, añada 2 µl a 40 ml de diluyente de conjugado BMD.	Use en menos de 2 horas tras su preparación.
Solución de trabajo Multi-Lite 1. Prepare solo el volumen necesario para el número de pruebas que va a hacer. 2. Añada 1 parte de Multi-Lite A a 1 parte de Multi-Lite B en un recipiente limpio de cristal o plástico. Mezcle por inversión. 3. Por ejemplo, añada 1 ml de Multi-Lite A a 1 ml de Multi-Lite B. Mezcle por inversión.	Almacene la solución Multi-Lite a +15-25 °C en un ambiente oscuro y úsela antes de que pasen 30 minutos tras su preparación.

9.0 Preparación de las muestras y los controles

Antes de hacer las pruebas, todas las muestras deben estar a temperatura ambiente. Todas las muestras y controles deben añadirse a la placa de captación de anticuerpos de TBB aproximadamente al mismo tiempo; para tanto, se recomienda utilizar una placa maestra o de carga para añadir muestras y controles y, después, transferirla a la placa de captación de anticuerpos de TBB.

9.1 Controles

- 9.1.1 Asegúrese de que los controles negativos y positivos se han mezclado correctamente antes de añadir el diluyente de muestras BMD.
- 9.1.2 Los controles se preparan a una relación de dilución de 1:200 añadiendo, por ejemplo, 5 µl de control a 1 ml de diluyente de muestra BMD.
- 9.1.3 Mezcle el control preparado por inversión o pipeteando un mínimo de 2 veces.
 - 9.1.4 Añada 50 µl de control negativo TBB a A1 y B1 de la placa de prueba.
 - 9.1.5 Añada 50 µl de control positivo TBB a C1 y D1 de la placa de prueba.

9.2 Muestras de suero

- 9.2.1 Se pueden realizar las pruebas sobre suero fresco, refrigerado o que se haya congelado previamente. Los sueros ictericos, lipémicos, hemolizados, tratados con calor o contaminados pueden provocar resultados erróneos y no deben utilizarse.
- 9.2.2 Si no se hacen las pruebas de las muestras inmediatamente, se deben refrigerar a 2-8 °C. Para periodos de congelación de más de 24 horas, congele el suero a -20 °C o menos.
- 9.2.3 Las muestras que contengan precipitado pueden provocar resultados de prueba inconsistentes y por ello se deben aclarar antes de realizar las pruebas sobre ellos.

- 9.2.4 Asegúrese de que la muestra de suero se ha mezclado bien antes de añadirla al diluyente de muestra BMD.
- 9.2.5 Las muestras se preparan a una relación de dilución de 1:200 añadiendo, por ejemplo, 5 µl de suero a 1 ml de diluyente de muestra BMD.
- 9.2.6 Mezcle la muestra preparada por inversión o pipeteando un mínimo de 2 veces.

9.3 Muestras de leche individual

- 9.3.1 Se pueden realizar las pruebas sobre leche fresca, refrigerada o que se haya congelado previamente. Las muestras de leche que presenten descomposición o contaminación pueden provocar resultados erróneos y no deben utilizarse.
- 9.3.2 Se pueden usar muestras de leche entera después de haberlas centrifugado durante 15 minutos a 2000 x g, o dejarlas en reposo si se han refrigerado (2-8 °C) para retirar la grasa. No se necesita pretratamiento para leche desgrasada.
- 9.3.3 Si no se hacen las pruebas de las muestras inmediatamente, se deben refrigerar a 2-8 °C. Para periodos de congelación de más de 24 horas, congele la leche a -20 °C o menos.
- 9.3.4 Las muestras de leche individual se preparan a una relación de dilución de 1:5 añadiendo, por ejemplo, 20 µl de leche individual a 100 µl de diluyente de muestra BMD.
- 9.3.5 Mezcle la muestra preparada por inversión o pipeteando un mínimo de 2 veces.

9.4 Muestras de leche a granel

- 9.4.1 Se pueden usar muestras de leche entera después de haberlas centrifugado durante 15 minutos a 2000 x g, o dejarlas en reposo si se han refrigerado (2-8 °C) para retirar la grasa. No se necesita pretratamiento para leche desgrasada.
- 9.4.2 Se pueden realizar las pruebas sobre leche fresca, refrigerada o que se haya congelado previamente. Las muestras de leche que presenten descomposición o contaminación pueden provocar resultados erróneos y no deben utilizarse.
- 9.4.3 Si no se hacen las pruebas de las muestras inmediatamente, se deben refrigerar a 2-8 °C. Para periodos de congelación de más de 24 horas, congele la leche a -20 °C o menos.
- 9.4.4 Las muestras de leche a granel se preparan a una relación de dilución de 1:1 añadiendo, por ejemplo, 50 µl de leche a granel a 50 µl de diluyente de muestra BMD.
- 9.4.5 Mezcle la muestra preparada por inversión o pipeteando un mínimo de 2 veces.

10.0 Protocolo de la prueba

- 10.1 Prepare las muestras y los controles como se ha descrito (se recomienda utilizar una placa de carga/maestra).
- 10.2 El control negativo de TBB y el control positivo de TBB se dispensan en 2 pocillos cada uno.
- 10.3 Todas las muestras se prueban una vez.
- 10.4 Transfiera 50 µl de los controles y las muestras a los pocillos adecuados de la placa recubierta y cubra la placa con una tapa precintada.
- 10.5 Ponga la placa a incubar, agitándola, durante 60 minutos a 37 ± 2 °C.
- 10.6 Lave los pocillos 6 veces con 250-300 µl de tampón de lavado 1X. Asegúrese de que todos los pocillos estén totalmente llenos y, después, totalmente vacíos. No ajuste los pasos de lavado recomendados. Un lavado inadecuado puede dar lugar a resultados incorrectos.
- 10.7 Seque por inversión con papel absorbente.
- 10.8 Añada 50 µl de conjugado de potencia a cada pocillo. Selle la placa y póngala a incubar, agitándola, durante 60 minutos a 37 ± 2 °C.
- 10.9 Lave los pocillos 6 veces con 250-300 µl de tampón de lavado 1X y seque mediante inversión con papel absorbente.
- 10.10 Añada 50 µl de solución de sustrato a cada pocillo de la microplaca. Inmediatamente después, lea la placa en el generador de imágenes Q-View de Quansys Biosciences, configurado a 220 segundos.

11.0 Resultados

11.1 Validación del rendimiento de la prueba

Cada placa se debe considerar por separado al calcular e interpretar los resultados del ensayo. Los resultados del control se deben validar antes de que se puedan interpretar los resultados de la muestra. Los criterios para el control negativo de tuberculosis bovina y el control positivo

de tuberculosis bovina están todos en la imagen macro del ensayo de tuberculosis bovina Enferplex proporcionada, y los resultados se calculan de forma automática.

11.2 Rango aceptable de los resultados del control

Si los criterios para los controles no se cumplen, el ensayo no es válido y se debe repetir.

11.3 Interpretación de los resultados

La imagen macro del ensayo de tuberculosis bovina Enferplex tiene una configuración de especificidad y sensibilidad alta para esta prueba.

Regla de los 2 antígenos

Las muestras que arrojen un resultado «Negativo» en la imagen macro se consideran no reactivas en la prueba de anticuerpos de tuberculosis bovina Enferplex, es decir, ninguna muestra fue positiva frente a 2 o más antígenos tanto en la configuración de alta sensibilidad como en la de alta especificidad.

Regla de los 2 antígenos

Las muestras que arrojen un resultado «Positivo» en la imagen macro se consideran reactivas en la prueba de anticuerpos de tuberculosis bovina Enferplex, es decir, la muestra fue positiva frente a 2 o más antígenos tanto en la configuración de alta sensibilidad como en la de alta especificidad.

12.0 Limitaciones del procedimiento

Al igual que con cualquier prueba biológica, esta prueba podría dar falsos positivos o falsos negativos debido a las condiciones locales. Al igual que ocurre con los resultados de todas las pruebas de tuberculosis (TT, interferón gamma, etc.), la exposición potencial y la respuesta a *Mycobacteria* en el ambiente debería interpretarse en el contexto de toda la información clínica, histórica y epidemiológica relevante relativa a los animales en estudio. Todo cambio o modificación del procedimiento podría afectar a los resultados. *Enfer Scientific no acepta responsabilidades sobre cualquier pérdida o daño, cualquiera que sea la causa, que surja de la interpretación de los resultados de la prueba.*

13.0 Disposición recomendada de la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	S05	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85
B	NC	S06	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86
C	PC	S07	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87
D	PC	S08	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88
E	S01	S09	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	S89
F	S02	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S90
G	S03	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S91
H	S04	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S92

CN = control TBB negativo

CP = control TBB positivo

S = Muestras sobre las que se han hecho pruebas, una sola vez

C301I17GB Marzo de 2022

Referencias

- Greenwald, R., Lyashchenko, O., Esfandary, J., Miller, M., Mikiere, S., Olsen, J.H., Ball, R., Dumonceaux, G., Schmitt, D., Moller, T., Payeur, J.B., Harris, B., Sofrenko, D., Waters, W.R., Lyashchenko, K.P. 2009. Highly accurate antibody assays for the early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. *Clin. Vaccine Immun.* 16, 605-612
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., *et al.* The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003 100 (13):7877-82
- More SJ, Good M, 2015. Understanding and managing bTB risk, perspectives from Ireland. *Vet. Microbiol.* 176, 209-218.