

Mycobacterium Bovis Antibody Test Kit

**Trousse de détection d'anticorps contre
*Mycobacterium bovis***

**Kit para detecção de anticorpos contra
*Mycobacterium bovis***

USO VETERINÁRIO

**Kit para la detección de Anticuerpos frente a
*Mycobacterium bovis***

***Mycobacterium bovis*-Antikörper-Testkit**

**Kit per la rilevazione degli anticorpi contro
*Mycobacterium bovis***



Validated and certified by the OIE as fit for the purposes defined in the kit insert. Registration number 20120107.

IDEXX ***M. bovis***

06-27743-02

Test With Confidence™

IDEXX

Mycobacterium Bovis Antibody Test Kit

For veterinary use only.

Name and Intended Use

IDEXX *M. bovis* Antibody Test Kit is intended for the detection of antibody to *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) in cattle serum and plasma samples. The test is designed to be used in conjunction with other methods for diagnosing and managing tuberculosis infection, however it is not suitable to diagnose individual animals or herds to be free of disease.

OIE Statement

The validation data for the IDEXX *Mycobacterium bovis* Antibody Test Kit have been certified in May 2012 by the OIE, based on expert review, as fit for the detection of antibody to *M. bovis* in cattle serum and plasma samples to be used as a supplemental test, in conjunction with other methods, for diagnosing and managing *M. bovis* infection.

The test also has utility when performing sero-surveys to understand prevalence and risk of *M. bovis* infection at a herd management level.

General Information

Bovine tuberculosis, caused by *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), continues to be an important livestock disease in many countries and its control and eradication is complicated by the lack of sensitive tests as well as the presence of significant wildlife reservoirs. Although tuberculosis tests based on cell-mediated responses (skin and gamma interferon) can detect animals in the early stages of infection, they still fail to detect up to 20% of truly infected animals.¹ The strategic supplemental use of an *M. bovis* antibody test may increase overall diagnostic power by detecting subsets of infected animals missed by current methods.^{2,3,4}

Descriptions and Principles

The IDEXX *M. bovis* antibody test kit is an enzyme immunoassay designed to detect the presence of antibody to *M. bovis* in bovine serum and plasma samples. A microtiter format has been configured by coating *M. bovis* recombinant antigens onto the wells of 96-well microtiter plates. Upon incubation of the test sample in the coated well, antibody to *M. bovis* forms a complex with the coated antigens. After washing away unbound material from the wells, an antibovine: horseradish peroxidase conjugate is added that binds to any bovine antibody attached in the wells. Unbound conjugate is washed away and TMB substrate is added. Color development is related to the amount of bound antibody against *M. bovis*.

Reagents		Volume
1	<i>M. bovis</i> Antigen Coated Plate	5
2	Positive Control — preserved with sodium azide	1 x 0.05 mL
3	Negative Control — preserved with sodium azide	1 x 0.05 mL
4	Conjugate — anti-bovine: IgG HRPO Conjugate	1 x 60 mL
5	Sample Diluent — preserved with sodium azide	1 x 120 mL
A	TMB Substrate	1 x 60 mL
B	Stop Solution	1 x 60 mL
C	Wash Concentrate (10X) — phosphate/tween wash; preserved with gentamicin	1 x 235 mL
Other Components: Zip lock bag		1

Note: See table at the end of the insert for a description of symbols used on the insert and labels of this kit.

Storage

Store the reagents at 2–8°C. Reagents are stable until expiration date, provided they have been stored properly.

Materials Required but Not Provided

- Precision micropipettes or multi-dispensing micropipettes
- Disposable pipette tips
- Graduated cylinder for wash solution
- 96-well microplate reader (equipped with 450 nm filter)
- Microplate washer (manual, semi-automatic or automatic system)
- Use only distilled or deionized water for preparation of the reagents used in the test
- Vortex or equivalent
- Tubes for diluting samples
- Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive)

Precautions and Warnings

- Handle all biological material as potentially infectious.
- Wear protective gloves / protective clothing / eye or face protection when handling samples and reagents.
- Refer to the product Material Safety Data Sheet for additional information.
- See the end of this insert for reagent hazard and precaution warnings.

Laboratory Practices

- Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Careful pipetting, timing, and washing throughout this procedure are necessary to maintain precision and accuracy. Use a separate pipette tip for each sample and control.
- Do not expose TMB solution to strong light or any oxidizing agents. Handle TMB solution with clean glass or plastic ware.
- All wastes should be properly decontaminated prior to disposal. Dispose of contents in accordance with local, regional, and national regulations.
- Care should be taken to prevent contamination of kit components. Do not pour unused reagents back into containers.
- Do not use kit past expiration date.

Sample Collection

Either fresh or previously frozen serum or plasma samples may be tested. All thawed samples must be thoroughly mixed prior to dilution.

Preparation of Reagents

Wash Solution

The Wash Concentrate (10X) may form precipitates upon 2–8°C storage; make certain that the Wash Concentrate (10X) is fully in solution prior to diluting. To prepare the Wash Solution, transfer 50 mL of the Wash Concentrate (10X) to a 500 mL volumetric flask or graduated cylinder; add 450 mL distilled/deionized water and mix thoroughly. The diluted solution can be stored at 18–26°C for up to 3 days or at 2–8°C for up to 2 weeks.

Samples and Controls

Dilute samples and kit controls 1/50 (1 part sample, 49 parts diluent) in Sample Diluent. Kit controls must be tested in duplicate for each test series.

Test Procedure

All reagents must be allowed to come to 18–26°C before use. Mix reagents by gentle inverting or swirling.

- 1 Obtain antigen-coated plate(s) from foil bag and record the sample position. If using partial plates, remove only those wells sufficient for samples to be tested. Place the remaining wells, along with desiccant, in the extra ziplock bag provided and return to 2–8°C.

- 2 Dispense 100 μ L of DILUTED Negative Control (NC) into duplicate wells.

- 3 Dispense 100 μ L of DILUTED Positive Control (PC) into duplicate wells.

- 4 Dispense 100 μ L of DILUTED sample into appropriate wells. Samples may be tested in duplicate but a single well is acceptable.

- 5 Cover the wells and incubate at 18–26°C for 60 minutes (\pm 5 minutes).

- 6 Remove the solution and wash each well with approximately 300 μ L of Wash Solution 3–5 times. Avoid plate drying between plate washings and prior to the addition of the next reagent. Tap each plate onto absorbent material after the final wash to remove any residual wash fluid.

- 7 Dispense 100 μ L of Conjugate into each well.

- 8 Cover the wells and incubate at 18–26°C for 30 minutes (\pm 2 minutes).

- 9 Repeat Step 6.

- 10 Dispense 100 μ L of TMB Substrate into each well.

- 11 Cover the wells and incubate at 18–26°C for 15 minutes (\pm 1 minute).

- 12 Dispense 100 μ L of Stop Solution into each well.

- 13 Measure and record absorbance values at 450nm, A(450).

14 Calculations:

Controls

$$NC\bar{x} = \frac{NC1 A(450) + NC2 A(450)}{2}$$

$$PC\bar{x} = \frac{PC1 A(450) + PC2 A(450)}{2}$$

Validity criteria

$$NC\bar{x} \leq 0.200$$

$$PC\bar{x} \geq 0.300$$

For invalid assays, technique may be suspect and the assay should be repeated following a thorough review of the package insert.

Samples

$$S/P = \frac{\text{Sample A}(450) - NC\bar{x}}{PC\bar{x} - NC\bar{x}}$$

The presence or absence of antibody to *M. bovis* is determined by calculating the sample to Positive (S/P) ratio for each sample.

15 Interpretation:

Negative

Positive

$$S/P < 0.30$$

$$S/P \geq 0.30$$

Note: IDEXX has instrument and software systems available which calculate results and provide data summaries.

Limitations of use

A negative result does not exclude the possibility of *M. bovis* infection. Antibody to *M. bovis* can be transient, can develop later in infection and not all infected animals will seroconvert. A positive test result suggests the presence of *M. bovis* antibodies in the subject animal. Due to potential exposure and response to environmental *Mycobacteria* (*M. kansasii*, for example), all tuberculosis test results (skin, gamma interferon and antibody ELISA), in conjunction with herd histories, should be considered when determining animal or herd classification. The test is not suitable to diagnose individual animals or herds to be free of disease.

OIE Certification

Summary of Validation Studies

Refer to www.oie.int registry of diagnostic tests for comprehensive descriptive information

Analytical Characteristics:

Precision: Plate CVs (Optical Density of Negative Sample) = 14.5% to 17.7%

Plate CVs (Optical Density of Weak Positive) = 8.7% to 11.9%

Plate CVs (Optical Density of Moderate Positive) = 5.7% to 10.3%

Repeatability: Plate to Plate (S/P value of Equivocal Sample) = 18% to 27%

Plate to Plate (S/P value of Positive Sample) = 12% to 21%

Analytical Specificity:

The data indicates that the kit is very specific with respect to other environmental Mycobacterial (e.g. *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*). *M. kansasii* isolations are rare, but infection with (high doses) of *M. kansasii* may result in false positive results, underscoring limitations of screening tests based on proteins conserved among Mycobacterial species.

Analytical Sensitivity: Not Applicable

Diagnostic Characteristics

Test Cut-off Determination

The test S/P cut-off (Sample to Positive ratio) of 0.30 was determined by targeting overall test specificity at 97% to 98% during development.

Diagnostic sensitivity (DSn) and specificity (DSp) estimates

The performance levels indicated below are based on 3 different ELISA lots manufactured with significant biological diversity with respect to kit components.

***M. bovis* ELISA results compared to culture positive status and samples from designated TB-free herds or regions.**

Test method under evaluation	IDEXX <i>M. bovis</i> Antibody ELISA	Target Species (Cattle)
Diagnostic sensitivity (using <i>M. bovis</i> culture positives)	N	307
	DSn	(64.6%)
	CI	(59.7% - 69.5%)
Diagnostic specificity (samples from TB-free areas)	N	1473
	DSp	(98%)
	CI	(97.5% - 98.4%)

Comparative Performance

The sensitivity level indicated below is based on 3 different ELISA lots manufactured with significant biological diversity with respect to kit components. The specificity data are representative of only one ELISA lot.

***M. bovis* ELISA results compared to single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICCT) positives and negatives.**

Test method of comparison	IDEXX <i>M. bovis</i> Antibody ELISA	Target Species (Cattle)
Diagnostic sensitivity (vs SICCT)	N	344
	DSn	(69.5%)
	CI	(64.4% - 74.1%)
Diagnostic specificity (vs SICCT)	N	144
	DSp	(97.2%)
	CI	(92.8% - 99.1%)

***M. bovis* ELISA results compared to Gamma Interferon (GIFN) positives.**

Test method of comparison	IDEXX <i>M. bovis</i> Antibody ELISA	Target Species (Cattle)
Diagnostic sensitivity (vs Gamma IFN)	N	166
	DSn	(62.7%)
	CI	(64.4% - 74.1%)
Diagnostic specificity (vs Gamma IFN)	N	No direct comparison performed on Gamma negatives from negative herds
	DSp	
	CI	

Agreement and Discrepancies

The nature of TB testing (classification based on visual slaughter inspection, relative success with culture and differences between cell-mediated [GIFN and SICCT] and humoral responses) generated, as expected, a large number of discrepancies. These discrepancies illustrate the complex nature of bovine TB and highlight the importance of applying multiple diagnostic tools in order to understand a more complete picture of the infection. Even though there were significant discrepancies between methods, the data show the increased sensitivity that can be attained by the strategic use of the antibody test-detecting subsets of true positives missed by other methods.

Reproducibility

A panel of characterized samples (n=30) and distinct lots of kits were provided to 2 laboratories in order to determine reproducibility at the end-user level. Each laboratory tested the panel, in duplicate, unsupervised, on each of the 3 kit lots provided.

The test panel was comprised of 30 samples in total (10 negatives and 20 positives). There was 100% agreement between kit lots at each of the 3 sites (includes testing at IDEXX).

References

1. de la Rúa-Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen, and R. S. Clifton-Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81:190-210.
2. Coad, M., Downs, S.H., Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G. Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2008. *The Veterinary Record.* 162: 382-384.
3. Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T. McGill, K., Collins, J.D. 2006. *Vet. Microbiol.* 112, 171-179.
4. Palmer, M. V., Waters, W. R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112, 181-190.

For technical assistance:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 or +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Contact your IDEXX area manager or distributor or visit our website: idexx.com/contactlpd

U.S. Vet. License No. 313

Product Code: 5A65.20

IDEXX and Test With Confidence are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries

©2015 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

Trousse de détection d'anticorps contre *Mycobacterium bovis*

Réservé à l'usage vétérinaire.

Définition et application

La trousse IDEXX *M. bovis* a été développée pour détecter les anticorps dirigés contre *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) dans les échantillons de plasma et de sérum bovins. Elle est conçue comme test complémentaire, en association avec d'autres méthodes, pour diagnostiquer et gérer l'infection par la tuberculose bovine: elle n'est pas destinée à déterminer le status d'animaux individuels ou de troupeaux vis-à-vis de la maladie.

Communiqué de l'OIE

Les données de validation de la trousse IDEXX de détection d'anticorps contre *Mycobacterium bovis* ont été certifiées sur la base de revues d'experts par l'OIE en mai 2012 comme propre au dépistage d'anticorps contre *M. bovis* dans les échantillons de sérum et de plasma bovins. Elle est conçue comme test complémentaire, en association avec d'autres méthodes, pour diagnostiquer et gérer l'infection par *M. bovis*.

Le test se révèle également utile lors de tests d'analyse du sérum pour comprendre la prévalence et le risque de l'infection par *M. bovis* au niveau de la gestion du troupeau.

Informations Générales

La tuberculose bovine, causée par *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), demeure une maladie importante des bovins dans de nombreux pays. Le manque de sensibilité des tests et la présence de nombreux réservoirs (animaux sauvages) rendent le contrôle et l'éradication difficiles. Bien que les tests de dépistage de la tuberculose basés sur les réponses à médiation cellulaire (test cutané et interféron gamma) permettent de détecter les animaux dans les premiers stades de l'infection, ils demeurent incapables de détecter jusqu'à 20% des animaux réellement infectés.¹ L'utilisation complémentaire stratégique d'un test de détection d'anticorps contre *M. bovis* peut augmenter la capacité de diagnostic globale en détectant les sous-ensembles d'animaux infectés non-dépistés avec les méthodes traditionnelles.^{2,3,4}

Description et principe

La trousse de détection d'anticorps contre *M. bovis* de IDEXX est une épreuve immunoenzymatique conçue pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre *M. bovis* dans les échantillons de sérum et de plasma bovins. Une méthode de microtitrage a été développée en sensibilisant des plaques de microtitrage de 96 puits d'antigènes recombinants de *M. bovis*. Après incubation des échantillons dans les puits, les anticorps dirigés contre *M. bovis* forment un complexe avec les antigènes. Après lavage du matériel non lié, on ajoute un conjugué anti-bovin: peroxidase de raifort se liant à tout anticorps bovin attaché aux puits. Le conjugué non lié est lavé et un substrat TMB est ajouté. Le développement de couleur qui en résulte est proportionnel à la quantité d'anticorps liés dirigés contre *M. bovis*.

Réactifs		Volume
1	Plaque sensibilisée avec des antigènes de <i>M. bovis</i>	5
2	Contrôle positif — conservateur: azoture de sodium	1 x 0,05 ml
3	Contrôle négatif — conservateur: azoture de sodium	1 x 0,05 ml
4	Conjugué — conjugué IgG anti-bovin: HRPO	1 x 60 ml
5	Diluant des échantillons — conservateur: azoture de sodium	1 x 120 ml
A	Substrat TMB	1 x 60 ml
B	Solution d'arrêt	1 x 60 ml
C	Concentré de lavage (10X) — tampon phosphate/Tween; conservateur: gentamicine	1 x 235 ml
Autres composants: sachet plastique hermétique réutilisable.		1

Remarque: voir le tableau à la fin du mode d'emploi pour la description des symboles utilisés dans ce mode d'emploi et sur les étiquettes de la trousse.

Conservation

Conservé les réactifs à 2–8°C. Les réactifs sont stables jusqu'à leur date de péremption à condition d'être conservés correctement.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de précision ou pipettes multicanaux
- Embouts de pipette à usage unique
- Éprouvette graduée pour la préparation de la solution de lavage
- Lecteur de plaque 96 puits (équipé d'un filtre à 450 nm)
- Système de lavage manuel, semi-automatique ou automatique
- Utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour la préparation des réactifs
- Vortex ou équivalent
- Microtubes pour la dilution des échantillons
- Couverts pour microplaques, aluminium ou adhésifs

Précautions d'emploi et mises en garde

- Manipuler tout matériel biologique comme étant potentiellement infectieux.
- Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux ou du visage lors de la manipulation des échantillons et des réactifs.
- Se reporter à la fiche de sécurité du produit pour plus d'informations.
- Voir à la fin du mode d'emploi pour les risques et mesures de prévention liés aux réactifs.

Pratiques de laboratoire

- Des résultats optimaux seront obtenus en se conformant de manière stricte au protocole fourni. La précision du test dépend des éléments suivants: pipetage, minutage et lavage minutieux au cours de cette procédure. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon et chaque contrôle.
- Ne pas exposer la solution de substrat TMB à la lumière directe du soleil ou à des agents oxydants. Veiller à la propreté de la verrerie et/ou du matériel de laboratoire en matière plastique utilisés lors de sa manipulation.
- Tous les déchets doivent être correctement décontaminés avant leur élimination. Éliminer les contenus selon les réglementations locales, régionales et nationales en vigueur.
- Éviter la contamination des composants du kit. Ne pas verser les réactifs non utilisés de nouveau dans les conteneurs.
- Ne pas utiliser les trousse après leur date de péremption.

Prélèvement d'échantillons

Du sérum ou des échantillons de plasma, frais ou congelés précédemment, peuvent être utilisés. Tous les échantillons décongelés doivent être mélangés avec soin avant d'être dilués.

Préparation des réactifs

Solution de lavage

Le concentré de lavage (10X) peut former des précipités lorsqu'il est entreposé à une température de 2–8°C; il est important que le concentré de lavage (10X) ne présente aucun précipité avant de le diluer. Pour préparer la solution de lavage, transférer 50 ml de concentré de lavage (10X) dans un flacon gradué de 500 ml; ajouter 450 ml d'eau déionisée or d'eau distillé et mélanger soigneusement. La solution de lavage diluée peut être conservée à 18–26°C pendant un maximum de 3 jours ou à 2–8°C durant 2 semaines au maximum.

Échantillons et contrôles

Diluer les échantillons et les contrôles de la trousse au 1/50 (1 part échantillon pour 49 part de diluant des échantillons) dans le diluant des échantillons. Les contrôles doivent être analysés en double pour chaque série de tests.

Mode opératoire

Porter tous les réactifs à 18–26°C avant utilisation et bien homogénéiser par agitation douce ou inversion.

- 1 Réserver le nombre de plaques nécessaires à la manipulation et noter la position des échantillons. En cas d'utilisation d'une portion de plaque seulement, retirer le nombre de barrettes requises pour les échantillons à tester et remplacer le reste de la plaque dans le sachet plastique fournis avec le dessiccant à 2–8°C.

- 2 Distribuer 100 μ l de contrôle négatif (CN) DILUE dans deux cupules.

- 3 Distribuer 100 μ l de contrôle positif (CP) DILUE dans deux cupules.

- 4 Distribuer 100 μ l de chaque échantillon DILUE dans les cupules appropriées. Les échantillons peuvent être testés en double mais un test en simple est acceptable.

- 5 Couvrir les puits et incuber à 18–26°C pendant 60 minutes (\pm 5 minutes).

- 6 Éliminer le liquide contenu dans les puits de la microplaque et laver 3–5 fois chaque puits avec environ 300 μ l de Solution de lavage. Éviter la dessiccation des puits de la microplaque entre les lavages et préalablement à la distribution du prochain réactif. Après le dernier lavage, vider le liquide résiduel contenu dans les puits par retournement et tapotement de la plaque sur du papier absorbant.

- 7 Distribuer 100 μ l de conjugué dans chaque puits.

- 8 Couvrir les puits et incuber à 18–26°C pendant 30 minutes (\pm 2 minutes).

- 9 Répéter l'étape 6.

- 10 Distribuer 100 μ l de substrat TMB dans chaque puits.

- 11 Couvrir les puits et incuber à 18–26°C pendant 15 minutes (\pm 1 minute).

- 12 Distribuer 100 μ l de solution d'arrêt dans chaque puits.

- 13 Lire et enregistrer les valeurs des densités optiques à 450 nm, A(450).

14 Calculs:

Contrôles

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450) + CP2 A(450)}{2}$$

Critères de validité

$$CN\bar{x} \leq 0,200$$

$$CP\bar{x} \geq 0,300$$

Si le test est invalide, la technique doit être suspectée et le test répété en suivant scrupuleusement le mode opératoire.

Échantillons

$$E/P = \frac{\text{Echantillon A(450)} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$$

La présence ou l'absence d'anticorps contre *M. bovis* est déterminée en calculant le rapport échantillon/contrôle positif pour chaque échantillon (E/P).

15 Interprétation:

Négatifs

Positifs

$$E/P < 0,30$$

$$E/P \geq 0,30$$

Remarque: IDEXX fournit équipements et logiciels pour le calcul des résultats et la synthèse des données.

Limites d'utilisation

Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection par *M. bovis*. Les anticorps contre *M. bovis* peuvent être transitoires ou peuvent se développer lorsque l'infection est plus avancée et la séroconversion peut ne pas se produire chez tous les animaux infectés. Un résultat de test positif suggère la présence d'anticorps contre *M. bovis* chez l'animal. Compte tenu de l'exposition potentielle et de la réponse aux *mycobactéries* environnementales (*M. kansasii*, par exemple), tous les résultats de tests de dépistage de la tuberculose (test cutané, interféron gamma et anticorps ELISA), de même que les antécédents du troupeau, devront être considérés avant de décider du statut de l'animal ou du troupeau vis-à-vis de la tuberculose. Ce test n'est pas destiné à déterminer le status d'animaux individuels ou de troupeaux vis-à-vis de la maladie.

Certification de l'OIE

Résumé des études de validation

Se reporter au registre des tests de diagnostic sur <http://www.oie.int> pour obtenir des renseignements complets et détaillés.

Caractéristiques analytiques

Précision: Coefficients de variation de la plaque
(densité optique d'un échantillon négatif) = 14,5% à 17,7%

Coefficients de variation de la plaque
(densité optique d'un échantillon faiblement positif) = 8,7% à 11,9%

Coefficients de variation de la plaque
(densité optique d'un échantillon positif) = 5,7% à 10,3%

Répatabilité: Inter-plaques (E/P d'un échantillon équivoque) = 18% à 27%
Inter-plaques (E/P d'un échantillon positif) = 12% à 21%

Spécificité analytique:

Les données indiquent que la trousse est très spécifique au regard des autres mycobactéries environnementales (p. ex. *M. Avium*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*). Les isolements de *M. kansasii* sont rares mais une infection par *M. kansasii* (à des doses élevées) peut donner lieu à des résultats faussement positifs, mettant ainsi en évidence les limites des tests de dépistage basés sur des protéines conservées des espèces mycobactériennes.

Sensibilité analytique: sans objet

Caractéristiques diagnostiques

Détermination de la valeur seuil du test

La valeur seuil E/P de positivité du test de 0,30 a été déterminée en ciblant une spécificité globale du test de 97% à 98% lors du développement.

Estimations de la sensibilité (DSn) et de la spécificité (DSp) diagnostiques

Les niveaux de performance figurant ci-dessous sont basés sur trois lots ELISA différents représentant une diversité biologique significative par rapport aux composants de la trousse.

Résultats du test ELISA *M. bovis* comparés avec des échantillons au statut de culture positif et à des échantillons provenant des troupeaux ou des régions déclarés indemnes de la tuberculose.

Méthode de test en cours d'évaluation	Test de détection des anticorps IDEXX <i>M. bovis</i>	Espèces cibles (bétail)
Sensibilité diagnostique (cultures positives à <i>M. bovis</i>)	N	307
	DSn	(64,6%)
	IC	(59,7% - 69,5%)
Spécificité diagnostique (échantillons de régions indemnes en tuberculose)	N	1473
	DSp	(98%)
	IC	(97,5% - 98,4%)

Évaluation comparative des performances

Le niveau de sensibilité indiqué ci-dessous est basé sur trois lots ELISA différents représentant une diversité biologique significative par rapport aux composants de la trousse. Les données de spécificité sont représentatives d'un seul lot ELISA.

Résultats du test *M. bovis* avec la méthode ELISA comparés au test d'intradermotuberculisation comparative (IDC).

Méthode de test de comparaison	Test de détection des anticorps IDEXX <i>M. bovis</i>	Espèces cibles (bétail)
Sensibilité diagnostique (par rapport au test IDC)	N	344
	DSn	(69,5%)
	IC	(64,4% - 74,1%)
Spécificité diagnostique (par rapport au test IDC)	N	144
	DSp	(97,2%)
	IC	(92,8% - 99,1%)

Résultats du test *M. bovis* par la méthode ELISA comparés au test interférons gamma (IFN gamma).

Méthode de test de comparaison	Test de détection des anticorps IDEXX <i>M. bovis</i>	Espèces cibles (bétail)
Sensibilité diagnostique (par rapport au test IFN gamma)	N	166
	DSn	(62,7%)
	IC	(64,4% - 74,1%)
Spécificité diagnostique (par rapport au test IFN gamma)	N	Pas de comparaison directe effectuée sur les gamma négatifs à partir des troupeaux négatifs
	DSp	
	IC	

Accord et divergences

La nature du test de dépistage de la tuberculose (classification basée sur une inspection visuelle lors de l'abattage, réussite relative avec la culture et les différences entre les réponses à médiation cellulaire [IFN gamma et IDC] et humorale) a généré, sans surprise, un grand nombre de divergences. Ces divergences illustrent la nature complexe de la tuberculose bovine et soulignent la nécessité d'utiliser de multiples outils de diagnostic de manière à avoir une vision plus complète de l'infection. En dépit de divergences significatives entre les méthodes, les données montrent la sensibilité accrue qui peut être atteinte grâce à l'utilisation stratégique d'un test de détection d'anticorps capable de révéler de vrais positifs non-détectés par d'autres méthodes.

Reproductibilité

Un panel d'échantillons caractérisés (n=30) ainsi que des lots de trousse distincts ont été fournis à deux laboratoires afin de déterminer la reproductibilité au niveau de l'utilisateur final. Chaque laboratoire a testé le panel en double et de façon indépendante sur chacun des trois lots de trousse fournis.

Le panel de test était constitué de 30 échantillons au total (10 négatifs et 20 positifs). Une concordance de 100% a été établie entre les lots sur chacun des trois sites (y compris les tests internes IDEXX).

Références

1. de la Rúa-Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen, and R. S. Clifton-Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81:190-210.
2. Coad, M., Downs, S.H., Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G. Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2008. *The Veterinary Record.* 162: 382-384.
3. Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T. McGill, K., Collins, J.D. 2006. *Vet. Microbiol.* 112, 171-179.
4. Palmer, M. V., Waters, W. R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112, 181-190.

Pour l'assistance technique:

IDEXX É.-U. Tél.: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tél.: +800 727 43399

Contactez votre responsable de secteur IDEXX votre distributeur ou visitez notre site web:
idexx.com/contactlpd

Perm. vét. des É.-U. N° 313

Code de produit: 5A65.20

IDEXX et Test With Confidence sont des marques de commerce ou des marques déposées d'IDEXX Laboratories, Inc. ou ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays.

©2015 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

Kit para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*

Para uso exclusivamente veterinário.

Nome e Indicações

O kit para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) da IDEXX destina-se a detectar anticorpos contra *M. bovis* em amostras de soro e plasma de gado. O teste foi desenvolvido para ser usado em conjunto com outros métodos para o diagnóstico e gerenciamento de infecção por tuberculose, no entanto ele não é suficiente para dizer se animais individuais ou rebanhos estão livres da doença.

Declaração da OIE

Os dados de validação para o Kit IDEXX *Mycobacterium bovis* antibody test, foram certificados em maio de 2012 pela OIE, com base na análise de especialistas, como apto para a detecção de anticorpos para *M. bovis* em amostras de soro e plasma de bovinos de forma ser usado como teste suplementar, em conjunto com outros métodos, para o diagnóstico e gestão da infecção por *M. bovis*.

O teste também é útil ao realizar exames sorológicos para compreender a prevalência e o risco de infecção por *M. bovis* no controle de rebanho.

Informações Gerais

A tuberculose bovina, causada pelo *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), continua a ser uma importante doença que acomete os animais de produção em muitos países e seu controle e erradicação é dificultada pela falta de testes sensíveis, bem como a presença significativa de animais selvagens como reservatórios. Embora os testes de tuberculose com base nas respostas mediadas por células (Tuberculina e interferon gama) possam detectar animais nas fases iniciais da infecção, eles ainda não conseguem detectar até 20% de animais verdadeiramente infectados.¹ A utilização estratégica suplementar de um teste baseado em reação de anticorpo ao *M. bovis*, pode aumentar o poder de diagnóstico através da detecção de subconjuntos de animais infectados não detectados pelos métodos atuais.^{2,3,4}

Descrição e Princípios

O kit para detecção de anticorpos contra *M. bovis* IDEXX é um ensaio imunoenzimático projetado para detectar anticorpos contra *M. bovis* em amostras de soro e plasma bovino. A microtitulação pode ser realizada impregnando-se placas de microtitulação de 96 cavidades com antígenos de *M. bovis* recombinantes. Durante a incubação da amostra de teste na cavidade impregnada com antígenos, anticorpos específicos contra *M. bovis*, se presentes, formam complexos com os antígenos impregnados. Em seguida, as cavidades são lavadas para retirar o material não aderido e é acrescentado um conjugado de anticorpo antiovino: peroxidase de raiz forte (HRPO), que se liga ao anticorpo bovino aderido às cavidades. Na próxima etapa, o conjugado que não se ligou ao antígeno é lavado e o substrato de tetrametilbenzidina (TMB) é acrescentado. O surgimento de cor varia de acordo com a quantidade de anticorpos anti-*M. bovis* ligados ao antígeno.

Reagentes		Volume
1	Placa Impregnada com antígeno de <i>M. bovis</i>	5
2	Controle Positivo — conservado com azida sódica	1 x 0,05 ml
3	Controle Negativo — conservado com azida sódica	1 x 0,05 ml
4	Conjugado — Conjugado anti-bovina IgG: HRPO	1 x 60 ml
5	Diluyente de Amostra — conservado com azida sódica	1 x 120 ml
A	Substrato TMB	1 x 60 ml
B	Solução de Interrupção	1 x 60 ml
C	Concentrado de Lavagem (10X) — tampão fosfato/tween 10X; conservado com gentamicina	1 x 235 ml
Outros componentes: embalagem zip lock.		1

Nota: Ver a tabela no final do inserte para uma descrição dos símbolos utilizados na inserte e nos rótulos deste kit.

Armazenagem

Conservar os reagentes a 2–8°C. Os reagentes são estáveis até a data de validade, desde que sejam devidamente conservados.

Materiais Necessários, mas Não Fornecidos

- Micropipetas de precisão e micropipetas multicanal
- Ponteiras de pipeta descartáveis
- Proveta graduada para a solução de lavagem
- Leitor de placas para 96 cavidades (equipado com filtro 450 nm)
- Lavador de microplaca (sistema manual, semi-automático ou automático)
- Usar somente água destilada ou deionizada para o preparo dos reagentes usados no teste
- Vórtex ou equivalente
- Tubos para diluir as amostras
- Tampa para placas (tampa plástica, papel alumínio ou adesivo)

Precauções e Advertências

- Manipular todos os materiais biológicos como potencialmente infectantes.
- Usar luvas de protecção / vestuário / protetores para o rosto e oculares ao manusear amostras e reagentes.
- Consultar a ficha de segurança do produto para informações adicionais.
- Ver no final do protocolo as medidas de prevenção relacionadas aos perigos potenciais de alguns reagentes.

Práticas laboratoriais

- Resultados ótimos serão obtidos seguindo-se rigorosamente o protocolo deste teste. Pipetagem cuidadosa, observação dos tempos de incubação e lavagens corretas durante todo o procedimento são necessários para manter a precisão e acurácia. Usar uma ponteira diferente para cada amostra e controle.
- Não expor a solução de TMB à luz forte ou a agentes oxidantes. Manusear a solução de TMB em recipientes limpos de vidro ou plástico.
- Todos os resíduos devem ser descontaminados adequadamente antes do descarte. Descartar os conteúdos de acordo com as normas locais, regionais e nacionais.
- Ter cuidado para evitar a contaminação dos componentes do kit. Não devolver a sobra do reagente ao frasco.
- Não utilizar kits com prazo de validade vencido.

Coleta de Amostras

O teste pode ser realizado em soro fresco ou previamente congelado. As amostras descongeladas devem ser bem misturadas antes de serem diluídas.

Preparo dos reagentes

Solução de Lavagem

A Concentrado de Lavagem (10X) pode se precipitar ao ser armazenada entre 2–8°C. Dissolva-a completamente antes de usar. Para preparar a solução de trabalho (1X), coloque 50 ml da Concentrado de Lavagem (10X) em um balão volumétrico ou proveta graduada, adicione 450 ml de água destilada/deionizada e misture bem. A solução diluída pode ser armazenada entre 18–26°C por até 3 dias ou entre 2–8°C por até 2 semanas.

Amostras e Controles

As amostras e controles do kit devem ser diluídos com o Diluente de Amostra na proporção 1/50 (uma parte de amostra para 49 de diluente). Os controles do kit devem ser testados em duplicata para cada série de testes.

Procedimento de Teste

Permitir que os reagentes atinjam 18–26°C, então mesclar gentilmente através de inversão ou movimentos circulares leves.

- 1 Obter Placa(s) impregnada(s) com antígeno e registrar a posição da amostra. Se utilizar parcialmente as placas, remova apenas as cavidades suficientes para as amostras a serem testadas. Guarde as cavidades remanescentes com o dissecante no saco ziplock fornecido adicionalmente e armazene entre 2–8°C.

- 2 Dispensar 100 µl de Controle Negativo (CN) DILUÍDO, em duplicata.

- 3 Dispensar 100 µl de Controle Positivo (CP) DILUÍDO, em duplicata.

- 4 Dispensar 100 µl de amostra DILUÍDA nas cavidades apropriadas. As amostras podem ser testadas em duplicata, mas uma única cavidade por amostra é aceitável.

- 5 Cubra as placas e incube-as entre 18–26°C por 60 minutos (± 5 minutos).

- 6 Remover o conteúdo líquido das cavidades da placa e lavar cada cavidade com aproximadamente 350 µl de Solução de Lavagem por 3–5 vezes. Evitar que a placa seque entre as lavagens e antes da adição do próximo reagente. Após a lavagem final, remover o fluido residual de lavagem de cada placa batendo-a firmemente em material absorvente.

- 7 Dispensar 100 µl de Conjugado em cada cavidade.

- 8 Cubra as placas e incube-as entre 18–26°C por 30 minutos (± 2 minutos).

- 9 Repetir passo 6.

- 10 Dispensar 100 µl de Substrato TMB em cada cavidade.

- 11 Cubra as placas e incube-as entre 18–26°C por 15 minutos (± 1 minuto).

- 12 Dispensar 100 µl de Solução de Interrupção em cada cavidade.

- 13 Meça e anote os valores de absorbância a 450 nm, A(450).

14 Cálculos:

Controles

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450) + CP2 A(450)}{2}$$

CrITÉRIOS de Validade

$$CN\bar{x} \leq 0,200$$

$$CP\bar{x} \geq 0,300$$

Para testes inválidos, deve-se suspeitar da técnica, e o teste deve ser repetido após a revisão cuidadosa do protocolo do produto.

Amostras

$$A/P = \frac{\text{Amostra A(450)} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$$

A presença ou não de anticorpos contra *M. bovis* é determinada calculando-se a razão amostra/Positivo (A/P) para cada amostra.

15 Interpretação:

Negativas

$$A/P < 0,30$$

Positivas

$$A/P \geq 0,30$$

Nota: IDEXX têm instrumentos e software disponíveis para o cálculo de resultados e a elaboração de resumo de dados.

Limitações do uso

Um resultado negativo não descarta a possibilidade de infecção por *M. bovis*. Os anticorpos contra *M. bovis* podem apresentar níveis flutuantes, podem surgir posteriormente na evolução da infecção, ou alguns animais infectados podem não desenvolver soroconversão. Um resultado positivo sugere que o animal testado possui anticorpos contra *M. bovis*. Devido à possibilidade de exposição e resposta a micobactérias no ambiente (p.ex. *M. kansasii*), todos os resultados positivos de testes para tuberculose (cutâneos, interferon gama e ELISA) e as histórias do rebanho devem ser levadas em conta ao determinar a classificação dos animais ou rebanhos. O teste não é suficiente para dizer se animais individuais ou rebanhos estão livres da doença.

Certificação OIE

Resumo de estudos de validação

Consulte o registro de testes diagnósticos em www.oie.int para informações descritivas completas.

Características da análise

Precisão: CV da placa (densidade óptica de amostra negativa) = 14,5% a 17,7%

CV da placa (densidade óptica de positivo fraco) = 8,7% a 11,9%

CV da placa (densidade óptica de positivo moderado) = 5,7% a 10,3%

Repetibilidade: Placa a placa (valores A/P de amostra equívoca) = 18% a 27%

Placa a placa (valores A/P de amostra positiva) = 12% a 21%

Especificidade da análise:

Os dados indicam que o kit é muito específico com relação a outras micobactérias ambientais (p. ex. *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*). Os isolamentos de *M. kansasii* são raros, mas a infecção com (altas doses) de *M. kansasii* pode resultar em resultados falso positivos, impondo limitações que comprometem testes de investigação baseados em proteínas conservadas dentre as espécies de micobactérias.

Sensibilidade da análise: não aplicável

Características do diagnóstico

Determinação do corte do teste

O corte do teste A/P (razão amostra para positivo) de 0,30 foi determinado pela especificidade geral do teste alvo em 97% a 98% durante o seu desenvolvimento.

Estimativas de sensibilidade do diagnóstico (SD) e de especificidade do diagnóstico (ED)

Os níveis de desempenho indicados abaixo são baseados em três lotes ELISA diferentes, fabricados com diversidade biológica significativa com relação ao seus componentes de kit.

Resultados ELISA para *M. bovis* comparados a estados positivos de culturas e amostras de rebanhos ou regiões designadas livres de TB.

Método de teste em avaliação	IDEXX <i>M. bovis</i> anticorpo ELISA	Espécie alvo (gado)
Sensibilidade do diagnóstico (usando culturas positivas de <i>M. bovis</i>)	N	307
	SD	(64,6%)
	CI	(59,7% - 69,5%)
Especificidade do diagnóstico (amostras de áreas sem TB)	N	1473
	ED	(98%)
	CI	(97,5% - 98,4%)

Desempenho comparado

O nível de sensibilidade indicado abaixo baseia-se em três lotes ELISA diferentes fabricados com diversidade biológica significativa com relação aos componentes do kit. Os dados de especificidade são representativos de somente um lote ELISA.

Resultados ELISA para *M. bovis* comparados a positivos e negativos de teste de tuberculina cervical comparativo intradermal único (SICCT) [single intradermal comparative cervical tuberculin test, SICCT].

Método de teste de comparação	IDEXX <i>M. bovis</i> anticorpo ELISA	Espécie alvo (gado)
Sensibilidade do diagnóstico (vs SICCT)	N	344
	DSn	(69,5%)
	CI	(64,4% - 74,1%)
Especificidade do diagnóstico (vs SICCT)	N	144
	ED	(97,2%)
	CI	(92,8% - 99,1%)

Resultados ELISA para *M. bovis* comparados a positivos para Gama Interferon (GIFN).

Método de teste de comparação	IDEXX <i>M. bovis</i> anticorpo ELISA	Espécie alvo (gado)
Sensibilidade do diagnóstico (vs Gama IFN)	N	166
	SD	(62,7%)
	CI	(64,4% - 74,1%)
Especificidade do diagnóstico (vs Gama IFN)	N	Comparação direta com negativos para gama em rebanhos negativos não foi realizada
	ED	
	CI	

Acordos e discrepâncias

As características do exame para TB (classificação com base em inspeção visual no abate, relativo sucesso em culturas e em diferenças entre respostas humorais mediadas por células [GIFN e SICCT]) geraram, conforme esperado, um número alto de discrepâncias. Essas discrepâncias ilustram a característica complexa da TB bovina e ressaltam a importância de aplicar múltiplas ferramentas diagnósticas para poder compreender um quadro mais completo da infecção.

Mesmo havendo discrepâncias significativas entre os métodos, os dados mostram a sensibilidade aumentada que pode ser obtida com o uso estratégico de subconjuntos de anticorpos de testes de detecção positivos verdadeiros que outros métodos não encontraram.

Reprodutibilidade

Um painel de amostras caracterizadas ($n = 30$) e de lotes distintos de kits foi fornecido a dois laboratórios para determinar a reprodutibilidade na instância do usuário final. Cada laboratório testou o painel, em duplicata, sem supervisão, para cada um dos três kits fornecidos.

O painel de teste era composto de 30 amostras no total (10 negativos e 20 positivos). Houve 100% de concordância entre os lotes de kits dos três centros (incluindo os testes na IDEXX).

Referências

1. de la Rúa-Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen, and R. S. Clifton-Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81:190-210.
2. Coad, M., Downs, S.H., Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G. Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2008. *The Veterinary Record.* 162: 382-384.
3. Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T. McGill, K., Collins, J.D. 2006. *Vet. Microbiol.* 112, 171-179.
4. Palmer, M. V., Waters, W. R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112, 181-190.

PRODUTO IMPORTADO. USO VETERINÁRIO.

IDEXX BRASIL LABORATORIOS LTDA. São Paulo-SP
Av.Brig.Faria Lima, 1478 Cj416, CEP: 01472-900
CNPJ: 00.377.455/0001-20
Resp. Tec.: Andrea L.C.Frezza CRMV-SP: 30.632

Para assistência técnica:

IDEXX EUA Tel: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contacte o representante local ou distribuidor IDEXX ou visite: idexx.com/contacttpld

IDEXX e Test With Confidence são marcas ou marcas registradas de IDEXX Laboratories Inc. ou de suas filiais nos Estados Unidos e/ou em outros países.

©2015 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.

Kit para la detección de Anticuerpos frente a *Mycobacterium bovis*

Para uso veterinario exclusivo.

Nombre y uso propuesto

El kit IDEXX *M. bovis* para la detección de anticuerpos frente a *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) se ha diseñado para el análisis de muestras de suero y plasma de bovino. Esta prueba está diseñada para utilizarse en combinación con otros métodos para el diagnóstico y manejo de la infección tuberculosa, sin embargo no es adecuada para el diagnóstico individual de animales o manadas como libres de la enfermedad.

Declaración de la OIE

Los datos de validación del kit IDEXX *M. bovis* para la detección de anticuerpos frente a *Mycobacterium bovis* han sido certificados en Mayo de 2012 por la OIE, basándose en la revisión por expertos, declarándose el kit apto para la detección de anticuerpos de *M. bovis* en muestras de plasma o suero de bovino para usarse como una prueba adicional, junto con otros métodos para el diagnóstico y el manejo de la infección por *M. bovis*.

La prueba también puede utilizarse al realizar estudios serológicos para comprender el predominio y el riesgo de infección de *M. bovis* a nivel de manejo del rebaño.

Información general

La tuberculosis bovina, causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), sigue siendo una importante enfermedad del ganado en muchos países, cuyo control y erradicación resultan complicados debido a la falta de pruebas sensibles, así como a la existencia de importantes reservorios salvajes. Aunque las pruebas para la detección de la tuberculosis basadas en las respuestas mediadas por células (prueba tuberculina intradérmica e interferón gamma) permiten detectar animales en las primeras etapas de la infección, fracasan en la detección de hasta el 20% de los animales realmente infectados¹. El uso estratégico y complementario de una prueba de detección de anticuerpos frente a *M. bovis* permite revelar subgrupos de animales infectados no detectados con los métodos actuales y aumentar así la eficacia total del diagnóstico.^{2,3,4}

Descripción y principios

El kit para la detección de anticuerpos frente a *M. bovis* de IDEXX es un inmunoensayo enzimático diseñado para el análisis de muestras bovinas de suero y plasma. Se ha creado un formato de microtitulación tapizando los 96 pocillos de cada placa con antígenos recombinantes de *M. bovis*. Al incubar la muestra que se desea analizar en el pocillo tapizado, el anticuerpo específico frente a *M. bovis* forma un complejo con los antígenos que revisten el pocillo. Tras eliminar mediante lavado el material no ligado de los pocillos, se añade un conjugado de anticuerpos antibovinos y peroxidasa de rábano picante (HRPO), que se une a cualquier anticuerpo bovino fijado en los pocillos. Mediante un nuevo lavado se elimina el conjugado no ligado y se añade el substrato TMB. La aparición de color está relacionada con la cantidad de anticuerpos frente a *M. bovis* que quedan fijados.

Reactivos		Volumen
1	Placa tapizada con Antígeno de <i>M. bovis</i>	5
2	Control Positivo — conservado con azida de sodio	1 x 0,05 ml
3	Control Negativo — conservado con azida de sodio	1 x 0,05 ml
4	Conjugado — conjugado IgG anti-bovino: HRPO	1 x 60 ml
5	Diluyente de la Muestra — conservado con azida de sodio	1 x 120 ml
A	Substrato TMB	1 x 60 ml
B	Solución de Frenado	1 x 60 ml
C	Solución de Lavado Concentrada (10X) — solución fosfato/Tween 10X; conservada con gentamicina	1 x 235 ml
Otros componentes: Bolsa de plástico de cierre hermético reutilizable		1

Nota: Ver tabla al final del protocolo para las explicaciones de los símbolos utilizados en este protocolo y en las etiquetas del kit.

Almacenamiento

Almacenar los reactivos a 2–8°C. Los reactivos son estables hasta su fecha de caducidad, siempre y cuando hayan sido almacenados en las condiciones correctas.

Materiales necesarios que no se suministran

- Micropipetas de precisión y micropipetas multidispensadoras
- Puntas de pipeta desechables
- Probetas graduadas para la solución de lavado
- Lector de placas de 96 pocillos (equipado con filtros de 450-nm)
- Lavador de microplacas, manual, semiautomática o automática
- Usar sólo agua destilada o desionizada para preparar los reactivos de la prueba
- Vortex o equivalente
- Tubos para la dilución de las muestras
- Cubiertas de placas (tapa, papel de aluminio o adhesivo, etc)

Precauciones y advertencias

- Considerar todo material biológico como potencialmente infeccioso cuando se manipule.
- Usar guantes de protección / prendas de protección / gafas o protección de la cara al manipular muestras y reactivos.
- Consultar la Ficha de Datos de Seguridad de Materiales del producto para obtener información adicional.
- Consultar al final de este protocolo para los peligros y medidas de prevención relacionados con los reactivos.

Prácticas de laboratorio

- Los resultados óptimos se obtendrán siguiendo estrictamente este protocolo. El pipeteo cuidadoso, la coordinación y el lavado durante todo este procedimiento son necesarios para mantener la precisión y exactitud. Usar una punta de pipeta diferente para cada muestra y control.
- No exponer las soluciones TMB a la luz fuerte o a cualquier agente oxidante. Manejar el Substrato TMB con material de cristal limpio o material plástico.
- Todos los desechos deben descontaminarse adecuadamente antes de ser eliminados. Desechar el contenido de conformidad con las regulaciones locales, regionales y nacionales.
- Extremar la precaución para evitar la contaminación de los componentes del kit. No verter los reactivos no utilizados de nuevo en contenedores.
- No utilizar los kits pasada su fecha de caducidad.

Obtención de Muestras

Se pueden analizar muestras de suero o plasma recién extraídas o previamente congeladas. Las muestras descongeladas deben mezclarse bien antes de su dilución.

Preparación de las reactivos

Solución de Lavado

Debido al almacenamiento a 2–8°C, puede que se formen precipitados en la Solución de Lavado Concentrada (10X); asegurarse de que la Solución de Lavado Concentrada (10X) está completamente disuelta antes de diluirla. Para preparar la solución de lavado, verter 50 ml de Solución de Lavado Concentrada (10X) en un matraz aforado o en una probeta graduada; añadir 450 ml de agua destilada/desionizada y mezclar bien. Se puede almacenar la solución diluida hasta un máximo de 3 días a 18–26°C o hasta un máximo de 2 semanas a 2–8°C.

Muestras y Controles

Realizar una dilución 1/50 (1 parte de muestra en 49 partes de diluyente) de las muestras y los controles del kit con el Diluyente de la Muestra. Los controles del kit se deben analizar por duplicado en cada serie de pruebas.

Procedimiento de la Prueba

Debe dejarse que todos los reactivos adquieran 18–26°C antes de usarlos. Los reactivos deberán mezclarse invirtiéndolos o agitándolos suavemente.

- 1 Obtener la Placa (o placas) tapizada(s) con antígeno y anotar la posición de las muestras. Si no se utiliza toda la placa, separar únicamente los pocillos necesarios para analizar las muestras. Guardar el resto de pocillos, junto con el desecante, en la bolsa de plástico de cierre hermético reutilizable y volver a almacenar a 2–8°C.

- 2 Dispensar 100 μ l de Control Negativo (CN) DILUIDO en dos pocillos.

- 3 Dispensar 100 μ l de Control Positivo (CP) DILUIDO en dos pocillos.

- 4 Dispensar 100 μ l de muestra DILUIDA en los pocillos apropiados. Las muestras pueden analizarse por duplicado pero el análisis en un solo pocillo es también aceptable.

- 5 Cubrir los pocillos e incubar a 18–26°C durante 60 minutos (\pm 5 min.).

- 6 Eliminar el contenido líquido de cada pocillo y lavar cada pocillo con aproximadamente 300 μ l de Solución de Lavado 3–5 veces. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente. Después del lavado final, eliminar el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente.

- 7 Dispensar 100 μ l de Conjugado a cada pocillos.

- 8 Cubrir los pocillos e incubar a 18–26°C durante 30 minutos (\pm 2 min.).

- 9 Repetir el paso 6.

- 10 Dispensar 100 μ l de Substrato TMB en cada pocillo.

- 11 Cubrir los pocillos e incubar a 18–26°C durante 15 minutos (\pm 1 min.).

- 12 Dispensar 100 μ l de Solución de Frenado en cada pocillo.

- 13 Medir y anotar los valores de absorbancia a 450nm, A(450).

14 Cálculos:

Controles

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450) + CP2 A(450)}{2}$$

Criterios de Validación

$$CN\bar{x} \leq 0,200$$

$$CP\bar{x} \geq 0,300$$

En los ensayos no válidos, debe sospecharse de la técnica, y el ensayo tiene que repetirse siguiendo una revisión meticulosa del protocolo suministrado con el producto.

Muestras

$$M/P = \frac{\text{Muestra A(450)} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$$

La presencia o ausencia de anticuerpos frente a *M. bovis* se determina calculando el cociente del resultado de la muestra dividido por el del Control Positivo (M/P) para cada muestra.

15 Interpretación:

Negativo

Positivo

$$M/P < 0,30$$

$$M/P \geq 0,30$$

Nota: IDEXX tiene a disposición instrumentos y sistemas de software para el cálculo de resultados y la elaboración de resúmenes de datos.

Limitaciones de uso

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de que exista infección por *M. bovis*. Los anticuerpos frente a *M. bovis* pueden aparecer sólo temporalmente y pueden desarrollarse más adelante durante la infección, de manera que no todos los animales infectados mostrarán seroconversión. Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos frente a *M. bovis* en el animal. Debido a la posible exposición y respuesta a las micobacterias (*M. kansasii*, por ejemplo) presentes en el ambiente, a la hora de clasificar al animal o al rebaño se deben considerar todos los resultados de las pruebas de tuberculosis (test cutáneo, interferón gamma y ELISA para detección de anticuerpos), junto con los antecedentes del rebaño. La pruebas no es adecuada para el diagnóstico individual de animales o manadas como libres de la enfermedad.

Certificación de la OIE

Resumen de estudios de validación

Consultar en el registro de pruebas de diagnóstico en www.oie.int para obtener información descriptiva integral

Características analíticas

Precisión: CV de la placa (Densidad Óptica de Muestra Negativa) = 14,5% a 17,7%

CV de la placa (Densidad Óptica de Positivo Débil) = 8,7% a 11,9%

CV de la placa (Densidad Óptica de Positivo Moderado) = 5,7% a 10,3%

Repetibilidad: De placa a placa (Valor M/P de Muestra Dudosa) = 18% a 27%

De placa a placa (Valor M/P de Muestra Positiva) = 12% a 21%

Especificidad analítica:

Los datos indican que el kit es muy específico con respecto a otras micobacterias ambientales (por ejemplo, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*). Los aislamientos de *M. kansasii* son poco frecuentes, pero la infección con (altas dosis) de *M. kansasii* pueden causar resultados falsos positivos, lo que acentúa las limitaciones de las pruebas de detección basadas en proteínas conservadas entre las especies micobacterianas.

Sensibilidad analítica: no aplica

Características de diagnóstico

Determinación de punto de corte de prueba

El punto de corte (coeficiente muestra/positivo) de la prueba de 0,30 se determinó con el fin de alcanzar una especificidad general de la prueba del 97% al 98% durante el desarrollo.

Estimaciones de especificidad de diagnóstico (Diagnostic specificity, DSp) y sensibilidad de diagnóstico (Diagnostic sensitivity, DS_n)

Los niveles de rendimiento que se indican a continuación se basan en 3 lotes ELISA diferentes fabricados con una significativa diversidad biológica con respecto a los componentes del kit.

Resultados del ELISA *M. bovis* comparados con cultivos de estatus positivo y muestras de rebaños o regiones declarados libres de tuberculosis.

Prueba en evaluación	IDEXX <i>M. bovis</i> Anticuerpos ELISA	Especies a las que se apunta (ganado)
Sensibilidad Diagnóstica (usando cultivos positivos <i>M. bovis</i>)	N	307
	DS _n	(64,6%)
	CI	(59,7% - 69,5%)
Especificidad Diagnóstica (muestras de zonas libres de tuberculosis)	N	1473
	DS _p	(98%)
	CI	(97,5% - 98,4%)

Rendimiento comparado

El nivel de sensibilidad que se indica a continuación se basa en 3 lotes ELISA diferentes fabricados con una significativa diversidad biológica con respecto a los componentes del kit. Los datos de especificidad representan solo un lote de ELISA.

Resultados del ELISA de *M. bovis* en comparación con positivos y negativos de la prueba de tuberculina cervical comparativa intradérmica simple (SICCT).

Prueba de comparación	IDEXX <i>M. bovis</i> Anticuerpos ELISA	Especies Diana (bovino)
Sensibilidad Diagnóstica (en comparación con SICCT)	N	344
	DSn	(69,5%)
	CI	(64,4% - 74,1%)
Especificidad Diagnóstica (en comparación con SICCT)	N	144
	DSp	(97,2%)
	CI	(92,8% - 99,1%)

Resultados de ELISA de *M. bovis* en comparación con positivos de interferón gamma (GIFN).

Prueba de comparación	IDEXX <i>M. bovis</i> Anticuerpos ELISA	Especies a las que se apunta (ganado)
Sensibilidad Diagnóstica (versus Interferón Gamma IFN)	N	166
	DSn	(62,7%)
	CI	(64,4% - 74,1%)
Especificidad Diagnóstica (versus Interferón Gamma IFN)	N	No se realizó comparación directa con gamma negativos de rebaños negativos
	DSp	
	CI	

Coincidencias y Discrepancias

La naturaleza de las pruebas de TB (clasificación basada en el examen de visual sacrificio, éxito relativo con el cultivo y las diferencias entre las respuestas celulares [GIFN y SICCT] y humorales) generó, como era de esperar, un gran número de discrepancias. Estas discrepancias demuestran la compleja naturaleza de la tuberculosis bovina TB y destacan la importancia de aplicar herramientas de diagnósticos múltiples a fin de comprender la infección de manera más completa. Aunque hubo importantes discrepancias entre los métodos, los datos muestran la sensibilidad incrementada que puede alcanzarse mediante el uso estratégico de las pruebas de anticuerpos que detectan subconjuntos de positivos verdaderos que otros métodos pasan por alto.

Reproducibilidad

Un panel de muestras caracterizadas ($n=30$) y distintos lotes del kit se proporcionaron a 2 laboratorios a fin de determinar la reproducibilidad del kit a nivel del usuario final. Cada laboratorio analizó el panel, por duplicado, sin supervisar, en cada uno de los lotes de 3 kits proporcionados. El panel constaba de 30 muestras en total (10 negativas y 20 positivas). Hubo un 100% de correlación entre los lotes del kit en cada uno de los 3 centros (incluyendo las pruebas realizadas en IDEXX).

Bibliografía

1. de la Rúa-Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen, and R. S. Clifton-Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81:190-210.
2. Coad, M., Downs, S.H., Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G. Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2008. *The Veterinary Record.* 162: 382-384.
3. Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T. McGill, K., Collins, J.D. 2006. *Vet. Microbiol.* 112, 171-179.
4. Palmer, M. V., Waters, W. R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112, 181-190.

Para asistencia técnica:

IDEXX EE.UU. Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contacte al representante local o distribuidor IDEXX o visite: idexx.com/contactlpd

N.º de registro: 2862-RD

(Al no estar la iELISA incluida explícitamente en la legislación, se recomienda su utilización con fines de investigación.)

IDEXX y Test With Confidence son marcas o marcas registradas de IDEXX Laboratories, Inc. o sus filiales en los Estados Unidos de América y/o en otros países.

©2015 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

Mycobacterium bovis-Antikörper-Testkit

Nur zum tierärztlichen Gebrauch.

Name und Verwendungszweck

Das IDEXX *M. bovis* Testkit ist ein Enzymimmunoassay zum den Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium bovis* in Serum- und Plasmaproben von Rindern. Der Test ist in Verbindung mit anderen Methoden zur Diagnose und zum Management der Rindertuberkulose einzusetzen, jedoch nicht zur Freitestung von Einzeltieren oder Herden geeignet.

OIE-Erklärung

Die Validierungsdaten für das IDEXX *Mycobacterium bovis* Antikörper-Test Kit wurden im Mai 2012 durch Experten der OIE begutachtet und auf dieser Basis das Kit als geeignet für die Erkennung von *M. bovis*-Antikörpern in Serum- und Plasmaproben vom Rind für die Verwendung als Zusatztest in Verbindung mit anderen Methoden zur Diagnose und Behandlung einer *M. bovis*-Infektion beurteilt.

Der Test eignet sich auch für die Verwendung bei Serountersuchungen zum Erlangen eines besseren Verständnisses der Prävalenz und Risiken einer *M. bovis*-Infektion auf Herdenbasis.

Allgemeine Informationen

Die durch *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) verursachte Tuberkulose der Rinder stellt in manchen Ländern nach wie vor eine bedeutende Erkrankung in Rinderbeständen dar und die Bekämpfung, bzw. Eradikation der Infektionskrankheit wird durch das Fehlen sensitiver Tests und das Vorliegen großer Erregerreservoirs in wildlebenden Tieren erschwert. Obwohl die auf zellvermittelten Reaktionen basierenden Tuberkulostests (intrakutane Tuberkulinprobe, Interferon-Test) infizierte Tiere bereits in einem frühen Stadium der Infektion detektieren können, bleiben trotz dieser Tests immer noch bis zu 20% der infizierten Rinder unentdeckt.¹ Die gesamte diagnostische Effizienz lässt sich durch den strategischen Einsatz eines *M. bovis*-Antikörper-Tests steigern, da die Infektion auf diese Weise auch bei den mit den herkömmlichen Methoden übersehenen infizierten Tieren diagnostiziert werden kann.^{2,3,4}

Beschreibung des Testprinzips

Das IDEXX *M. bovis* Testkit ist ein Enzymimmunoassay, der speziell für den Nachweis von Antikörpern gegen *M. bovis* in Serum- und Plasmaproben von Rindern entwickelt wurde. Beim Mikrotiterformat des Tests wurden die Vertiefungen der 96er-Mikrotiterplatte mit rekombinanten *M. bovis* -Antigenen beschichtet. Nach Inkubation der Probe in den beschichteten Vertiefungen bilden die *M. bovis* -Antikörper mit den in der Beschichtung enthaltenen Antigenen Komplexe. Nach dem Waschvorgang zur Entfernung von nicht gebundenem Material aus den Vertiefungen wird ein Anti-Rind- Meerrettich-Peroxidase-Konjugat hinzugefügt, das an die bovinen Antikörper in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte bindet. Nicht gebundenes Konjugat wird beim nächsten Waschvorgang entfernt. Danach wird das TMB-Substrat hinzugefügt. Die Intensität der Farbentwicklung korreliert direkt mit der Menge an gebundenen Antikörpern gegen *M. bovis*.

Reagenzien

Menge

	Reagenzien	Menge
1	Mit <i>M. bovis</i> -Antigen beschichtete Testplatte (inaktiviert)	5
2	Positive Kontrolle — Konservierungsstoff: Natriumazid	1 x 0,05 ml
3	Negative Kontrolle — Konservierungsstoff: Natriumazid	1 x 0,05 ml
4	Konjugat — Anti-Rind IgG HRPO Konjugat	1 x 60 ml
5	Probenverdünner — Konservierungsstoff: Natriumazid	1 x 120 ml
A	TMB-Substrat	1 x 60 ml
B	Stopplösung	1 x 60 ml
C	Waschkonzentrat (10X) — Phosphat/Tween-Waschlösung; Konservierungsstoff: Gentamicin	1 x 235 ml
Sonstige Komponenten: Plastikbeutel mit Druckverschluß.		1

Hinweis: Am Ende dieser Gebrauchsinformation befindet sich eine Tabelle, welche die im Text und auf den Etiketten verwendeten Symbole erläutert.

Lagerung

Reagenzien bei 2–8°C lagern. Bei entsprechender Lagerung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum stabil.

Notwendiges Material, das nicht mitgeliefert wird

- Präzisionspipetten und Multikanalmikropipetten
- Einweg-Pipettenspitzen
- Graduierter Zylinder für die Waschlösung
- Photometer (für 96 Vertiefungen, ausgestattet mit 450 nm Messfiltern)
- Manuelles, halbautomatisches oder automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Zur Vorbereitung der Reagenzien nur destilliertes oder demineralisiertes Wasser verwenden
- Vortex-Mischer oder gleichwertiger Mischer
- Röhrchen für die Verdünnung der Proben
- Abdeckungen für Mikrotiterplatten (Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie)

Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- Alle biologischen Substanzen als potenziell infektiös behandeln.
- Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz oder Gesichtsschutz beim Umgang mit Proben und Reagenzien verwenden.
- Weitere Informationen sind im Sicherheitsdatenblatt enthalten.
- Nähere Informationen zur Reagenziensicherheit und Vorsichtsmaßnahmen befinden sich am Ende der Gebrauchsinformation.

Laborpraktiken

- Bei strikter Einhaltung dieser Anweisungen werden optimale Ergebnisse erzielt. Sorgfältiges Pipettieren und Waschen sowie eine genaue Zeiteinteilung während der Testdurchführung sind notwendig, um die Genauigkeit der Werte zu gewährleisten. Für jede Probe und Kontrolle eine neue Pipettenspitze benutzen.
- Substrat nicht starkem Licht oder oxidierenden Mitteln aussetzen. Nur saubere Glas- oder Plastikbehälter benutzen.
- Alle Abfälle vor der Entsorgung ordnungsgemäß dekontaminieren. Den Inhalt im Einklang mit den lokalen, regionalen und nationalen Bestimmungen entsorgen.
- Eine Verunreinigung der Bestandteile des Testkits sorgfältig vermeiden. Keine unbenutzten Reagenzien zurück in die Originalflaschen schütten.
- Die Bestandteile nicht nach Ablauf des Verfalldatums benutzen.

Probenmaterial

Als Probenmaterial können sowohl frische als auch tiefgefroren gelagerte Serum- oder Plasmaproben verwendet werden. Aufgetaute Proben müssen vor der Verdünnung sorgfältig gemischt werden.

Vorbereitung der Proben

Waschlösung

Das Waschkonzentrat (10X) vor Gebrauch auf 18–26°C aufwärmen lassen und durch leichtes Schütteln mischen, um ausgefällte Salze aufzulösen. Das Waschkonzentrat (10X) vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem/demineralisiertem Wasser verdünnen (z.B.: 50 ml Waschkonzentrat (10X) mit 450 ml destilliertem Wasser verdünnen). Die Waschlösung kann bei 18–26°C drei Tage lang und bei 2–8°C bis zu zwei Wochen lang aufbewahrt werden.

Proben und Kontrollen

Proben und Kontrollen mit dem Probenverdünner im Verhältnis 1/50 verdünnen (1 Teil Probe, 49 Teile Probenverdünner). Die Kontrollen müssen für jede Testserie im Doppelansatz mitgeführt werden.

Testanweisung

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch auf 18–26°C gebracht werden. Die Reagenzien durch leichtes Schütteln mischen.

- 1 Die beschichteten Platten nehmen und die Position der Proben notieren. Falls nur ein Teil der Platte verwendet wird, die notwendige Menge an Vertiefungen entnehmen und den Rest der Platte mit dem Trockenmittel in dem mitgelieferten Plastikbeutel bei 2–8°C zurückstellen.

- 2 100 µl VERDÜNNTE negative Kontrolle (NK) in zwei Vertiefungen geben.

- 3 100 µl VERDÜNNTE positive Kontrolle (PK) in zwei Vertiefungen geben.

- 4 100 µl der VERDÜNNTEN Probe in die entsprechenden Vertiefungen geben. Die Proben können im Einfachansatz getestet werden, empfehlenswert ist jedoch, sie im Doppelansatz zu testen.

- 5 Vertiefungen abdecken und 60 Minuten (±5 Minuten) bei 18–26°C inkubieren.

- 6 Den flüssigen Inhalt aus den Vertiefungen entfernen und sodann mit etwa 300 µl Waschlösung 3- bis 5-mal waschen. Dabei ein Austrocknen der Platte zwischen den Waschschrritten und der Zugabe des nächsten Reagenz vermeiden. Nach dem letzten Waschen die Platte auf saugfähigem Material ausklopfen, um verbleibende Restflüssigkeit zu entfernen.

- 7 100 µl Konjugat in jede Vertiefung geben.

- 8 Vertiefungen abdecken und 30 Minuten (±2 Minuten) bei 18–26°C inkubieren.

- 9 Den Schritt 6 wiederholen.

- 10 100 µl TMB-Substrat in jede Vertiefung pipettieren.

- 11 Vertiefungen abdecken und 15 Minuten (±1 Minuten) bei 18–26°C inkubieren.

- 12 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung geben.

- 13 Messen und Notieren der Extinktionswerte bei 450 nm, A(450).

14 Berechnungen:

Kontrollen

$$NK\bar{x} = \frac{NK1 A(450) + NK2 A(450)}{2}$$

$$PK\bar{x} = \frac{PK1 A(450) + PK2 A(450)}{2}$$

Validitätskriterien

$$NK\bar{x} \leq 0,200$$

$$PK\bar{x} \geq 0,300$$

Ungültige Ergebnisse sind möglicherweise auf eine nicht sachgemäße Durchführung zurückzuführen. Der Test sollte nach erneutem, sorgfältigem Durchlesen der Gebrauchsinformation wiederholt werden.

Proben

$$P/PK = \frac{\text{Probe A(450)} - NK\bar{x}}{PK\bar{x} - NK\bar{x}}$$

Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Antikörpern gegen *M. bovis* wird bestimmt, indem für jede Probe das Verhältnis der Probe zur positiven Kontrolle (P/PK) berechnet wird.

15 Interpretation:

Negativ

Positiv

$$P/PK < 0,30$$

$$P/PK \geq 0,30$$

Hinweis: IDEXX bietet auch Geräte und Softwaresysteme zur Berechnung der Ergebnisse und zur Datenverarbeitung an.

Grenzen bei der Anwendung

Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit *M. bovis* nicht aus. Antikörper gegen *M. bovis* können transient vorhanden sein oder sich erst in einem späteren Stadium der Infektion entwickeln. Außerdem kommt es nicht bei allen infizierten Tieren zur Serokonversion.

Ein positives Testergebnis spricht für das Vorliegen von *M. bovis* -Antikörpern im betreffenden Tier. Aufgrund der potenziellen Exposition und Reaktion auf Umweltmykobakterien (z. B. *M. kansasii*) sollten zur Beurteilung des Einzeltier- oder Herdenstatus alle Ergebnisse von Tuberkulosestests (intrakutane Tuberkulinprobe, Interferon-Test, ELISA-Antikörpertest) im Zusammenhang mit der Herdenanamnese bewertet werden. Der Test ist nicht zur Freitestung von Einzeltieren oder Herden geeignet.

OIE Certification

Zusammenfassung der Validierungsstudien

Umfassende Beschreibungen und Informationen sind dem Verzeichnis der Diagnosetests auf www.oie.int zu entnehmen.

Analytische Merkmale

- Präzision:** Platten-VK (Optische Dichte der negativen Probe) = 14,5% bis 17,7%
Platten-VK (Optische Dichte der schwach positiven Probe) = 8,7% bis 11,9%
Platten-VK (Optische Dichte der mäßig positiven Probe) = 5,7% bis 10,3%
- Wiederholbarkeit:** Platte zu Platte (P/PK-Wert der grenzwertigen Probe) = 18% bis 27%
Platte zu Platte (P/PK-Wert der positiven Probe) = 12% bis 21%

Analytische Spezifität:

Die Daten zeigen eine sehr hohe Spezifität des Kits in Bezug auf andere umfeldspezifische Mykobakterien (z. B. *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*). *M. kansasii* Isolierungen sind selten, doch bei einer Infektion mit (starker Konzentration) von *M. kansasii* sind falsch-positive Ergebnisse möglich. Dies unterstreicht die Grenzen der proteinbasierten Screening-Tests unter den Mycobacterium-Spezies.

Analytische Sensitivität: Nicht anwendbar

Diagnostische Merkmale

Cutoff-Bestimmung

Ein P/PK-Cutoff (OD-Positivkontrolle) von 0,30 wurde bestimmt, indem bei der Entwicklung eine allgemeine Testspezifität von 97% bis 98% angestrebt wurde.

Schätzungen der diagnostischen Sensitivität (DSn) und Spezifität (DSp)

Die unten angegebenen Leistungsstufen basieren auf 3 verschiedenen ELISA-Chargen, die in Bezug auf die Kitbestandteile mit signifikanter biologischer Unterschiedlichkeit hergestellt wurden.

***M. bovis* ELISA-Ergebnisse im Vergleich zu kulturpositivem Status und Proben aus bestimmten TB-freien Herden oder Regionen.**

Evaluierte Testmethode	IDEXX <i>M. bovis</i> - Antikörper-ELISA	Zielspezies (Rind)
Diagnostische Sensitivität (bei Verwendung von <i>M. bovis</i> kulturpositiven Proben)	N	307
	DSn	(64.6%)
	KI	(59,7% - 69,5%)
Diagnostische Spezifität (Proben aus TB-freien Gebieten)	N	1473
	DSp	(98%)
	KI	(97,5% - 98,4%)

Vergleichbare Leistung

Die unten angegebenen Sensitivitätsstufen basieren auf 3 verschiedenen ELISA-Chargen, die in Bezug auf die Kitbestandteile mit signifikanter biologischer Unterschiedlichkeit hergestellt wurden. Die Spezifitätsdaten gelten nur für eine ELISA-Charge.

***M. bovis* ELISA-Ergebnisse im Vergleich zu positiven und negativen einzelnen intradermalen vergleichenden zervikalen Tuberkulintests (SICCT).**

Vergleichstestmethode	IDEXX <i>M. bovis</i> Antikörper ELISA	Zielspezies (Rind)
Diagnostische Sensitivität (ggü. SICCT)	N	344
	DSn	(69,5%)
	KI	(64,4% - 74,1%)
Diagnostische Spezifität (ggü. SICCT)	N	144
	DSp	(97,2%)
	KI	(92,8% - 99,1%)

***M. bovis* ELISA-Ergebnisse im Vergleich zu positiven Gamma-Interferon-Tests (GIFN).**

Vergleichstestmethode	IDEXX <i>M. bovis</i> Antikörper ELISA	Zielspezies (Rind)
Diagnostische Sensitivität (ggü. SICCT)	N	166
	DSn	(62,7%)
	KI	(64,4% - 74,1%)
Diagnostische Spezifität (ggü. SICCT)	N	Es wurde kein direkter Vergleich von Gamma-negativen Ergebnissen aus negativen Herden durchgeführt.
	DSp	
	KI	

Übereinstimmung und Diskrepanzen

Die Art der TB-Untersuchung (Klassifizierung basierend auf Sichtprüfung der Schlachttiere, relativer Erfolg mit Kultur und Unterschiede zwischen zellvermittelten [GIFN und SICCT] und humoralen Reaktionen) verursachte erwartungsgemäß zahlreiche Diskrepanzen. Diese Diskrepanzen reflektieren die Komplexität der bovinen TB und unterstreichen die Wichtigkeit der Anwendung mehrerer Diagnosemittel, um ein vollständigeres Bild der Infektion zu erhalten. Trotz wesentlicher Diskrepanzen unter den Methoden zeigten die Daten, dass bei zielgerichteter Verwendung von Teilsätzen der Antikörper-erkennenden Tests eine erhöhte Sensitivität für wahre positive Ergebnisse, die bei anderen Methoden übersehen werden, erlangt wird.

Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit auf Endverbraucherebene erhielten 2 Labore eine Reihe gekennzeichnete Proben (n=30) und unterschiedliche Kit-Chargen. Jedes Labor prüfte die Testreihe im Duplikat und unbeaufsichtigt an jeder der 3 bereitgestellten Kitchargen. Die Testreihe umfasste insgesamt 30 Proben (10 negative und 20 positive). An den 3 Teststandorten (zwei Labors und IDEXX) wurde eine 100% ige Übereinstimmung bei allen Kitchargen erzielt.

Literatur

1. Palmer, M. V., Waters, W. R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112, 181-190.
2. de la Rúa-Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen, and R. S. Clifton-Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81:190-210.
3. Coad, M., Downs, S.H., Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G. Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2008. *The Veterinary Record.* 162: 382-384.
4. Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T. McGill, K., Collins, J.D. 2006. *Vet. Microbiol.* 112, 171-179.

Technische Unterstützung:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 oder +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Kontaktieren Sie Ihren lokalen IDEXX-Vertreter oder besuchen Sie unsere Webseite:
idexx.com/contactipd

IDEXX und Test With Confidence sind Schutzmarken oder eingetragene Schutzmarken von IDEXX Laboratories, Inc. oder eines Tochterunternehmens von IDEXX in den Vereinigten Staaten und/oder in anderen Ländern

©2015 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Kit per la rilevazione degli anticorpi contro *Mycobacterium bovis*

Esclusivamente per uso veterinario.

Nome del prodotto e utilizzo

Il kit IDEXX *M. bovis* per la rilevazione degli anticorpi contro *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) è destinato all'uso per il rilevamento degli anticorpi contro *M. bovis* in campioni di siero e di plasma bovini. Il test è stato progettato per essere usato in combinazione con altri metodi di analisi e gestione della infezione da tubercolosi, per quanto non è adatto a diagnosticare singoli animali o mandrie come liberi dalla malattia.

Dichiarazione OIE

Il dati di validazione del kit IDEXX *M. bovis* sono stati certificati dall'OIE nel maggio del 2012, sulla base della revisione di esperti del settore, come idoneo per il rilevamento degli anticorpi all'*M. bovis* nei campioni di siero e plasma del bestiame da utilizzare come test supplementare, in concomitanza con altri metodi, per la diagnosi e la gestione dell'infezione da *M. bovis*.

Il test è utile anche durante lo svolgimento di siero-sondaggi per capire la prevalenza e il rischio di infezione da *M. bovis* a livello di gestione delle mandrie.

Informazioni generali

La tubercolosi bovina, causata da *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), continua a rappresentare un'importante malattia del bestiame in molti paesi e il suo controllo ed eradicazione vengono complicati dalla mancanza di test sensibili, oltre che dalla presenza di numerosi animali selvatici che fungono da serbatoi dell'infezione. Sebbene siano in grado di identificare gli animali infetti nelle prime fasi dell'infezione, i test per la tubercolosi basati sulle risposte cellulo-mediate (risposta cutanea e presenza di gamma interferone) non riescono a rilevare fino al 20% degli animali con infezione già in corso.¹ L'uso complementare strategico di un test anticorpale per *M. bovis* può aumentare la capacità diagnostica complessiva grazie all'identificazione dei sottogruppi di animali infetti non rilevati dai metodi correntemente impiegati.^{2,3,4}

Descrizione e principi del test

Il kit IDEXX *M. bovis* è un saggio immunoenzimatico concepito per rilevare la presenza di anticorpi contro *M. bovis* in campioni di siero e plasma bovini. Si tratta di un test che utilizza piastre per microtitolazione a 96 pozzetti rivestite da antigeni di *M. bovis* ricombinanti. Durante l'incubazione del campione, gli anticorpi contro *M. bovis* formano un complesso con gli antigeni del rivestimento. Dopo aver rimosso dai pozzetti, mediante lavaggio, il materiale non legato, viene aggiunto un coniugato di anticorpi anti-bovino-perossidasi di rafano (HRPO) che si lega agli anticorpi di bovino legati ai pozzetti. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio e il substrato TMB viene aggiunto nei pozzetti. Lo sviluppo di colore è correlato alla quantità di anticorpi contro *M. bovis* che si legano.

Reagenti		Volume
1	Piastre rivestite di antigene <i>M. bovis</i>	5
2	Controllo positivo — contiene sodio azide come conservante	1 x 0,05 ml
3	Controllo negativo — contiene sodio azide come conservante	1 x 0,05 ml
4	Coniugato — coniugato di IgG anti-bovino:HRPO	1 x 60 ml
5	Diluente del campione — contiene sodio azide come conservante	1 x 120 ml
A	Substrato TMB	1 x 60 ml
B	Soluzione di arresto	1 x 60 ml
C	Soluzione di lavaggio concentrata (10X) — fosfato/Tween; contiene gentamicina come conservante	1 x 235 ml
Altri componenti: sacchetti con chiusura lampo		1

Nota: vedere la tabella alla fine dell'insero tecnico per la descrizione dei simboli usati nell'insero e nelle etichette.

Conservazione

Conservare i reagenti a una temperatura di 2–8°C. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza a condizione che siano stati conservati correttamente.

Notwendiges Material, das nicht mitgeliefert wird

- Pipette di precisione o pipette multicanale idonee all'erogazione
- Puntali per pipette monouso
- Cilindro graduato per la soluzione di lavaggio
- Lettore di piastre per microtitolazione in grado di misurare la densità ottica (OD) a 450 nm.
- Sistema di lavaggio per piastre (manuale, semi-automatico o automatico)
- Usare solo acqua distillata o deionizzata per la preparazione dei reagenti
- Vortex o simile
- Provette per la diluizione dei campioni
- Copripiastro o sigillante per piastre (coperchio, foglio di alluminio o adesivo)

Precauzioni e avvertenze per gli utenti

- Maneggiare tutti i materiali biologici come potenzialmente infettivi.
- La soluzione substrato è irritante per occhi, apparato respiratorio e pelle. Evitare il contatto con la pelle e gli occhi.
- Indossare guanti protettivi/abbigliamento protettivo/protezione per viso e occhi.
- Fare riferimento alla scheda di sicurezza MSDS del prodotto per maggiori informazioni.

Pratiche di laboratorio

- La stretta osservanza di questo protocollo permette di ottenere risultati ottimali. È necessario eseguire con attenzione la pipettatura e il lavaggio per tutta la durata di questa procedura al fine di garantire precisione e accuratezza.
- Tutti i rifiuti devono essere correttamente decontaminati prima dello smaltimento. Smaltire il contenuto in accordo con le normative locali, regionali e nazionali.
- Fare attenzione per evitare la contaminazione dei componenti del kit. Non riversare nei loro contenitori i reagenti inutilizzati.
- Non utilizzare i componenti oltre la data di scadenza.

Prelievo dei campioni

Utilizzare campioni di siero o plasma freschi o precedentemente congelati. Miscelare accuratamente tutti i campioni scongelati prima della diluizione.

Preparazione dei reagenti

Soluzione di lavaggio

La soluzione di lavaggio concentrata (10X) può formare precipitati durante la conservazione a 2–8°C. Assicurarsi che la soluzione di lavaggio concentrata (10X) si trovi completamente in soluzione prima della diluizione. Per preparare la soluzione di lavaggio, trasferire 50 ml di soluzione di lavaggio concentrata (10X) in un recipiente volumetrico da 500 ml o in un cilindro graduato; aggiungere 450 ml di acqua distillata/deionizzata e miscelare accuratamente. La soluzione diluita può essere conservata a 18–26°C per un periodo non superiore a 3 giorni o a 2–8°C per un periodo fino a 2 settimane.

Campioni e controlli

Diluire i campioni e i controlli del kit con rapporto 1/50 (1 parte di campione e 49 parti di diluente) nel diluente campione. I controlli del kit devono essere analizzati in duplicato per ogni serie di test.

Protocollo del test

Prima dell'uso tutti i reagenti devono raggiungere 18–26°C. I reagenti devono essere miscelati mediante centrifugazione delicata o movimenti circolari brevi.

- 1 Estrarre le piastre rivestite di antigeni dalla confezione di alluminio e registrare la posizione dei campioni. Se si utilizza solo una parte delle piastre, estrarre solamente il numero di pozzetti sufficiente per i campioni da analizzare. Posizionare i pozzetti rimanenti, con l'essiccante, nel sacchetto di plastica con chiusura lampo aggiuntivo e rimetterli in frigorifero a 2–8°C.

- 2 Erogare 100 µl di controllo negativo (CN) DILUITO in due pozzetti della piastra da analizzare.

- 3 Erogare 100 µl di controllo positivo (CP) DILUITO in due pozzetti della piastra da analizzare.

- 4 Erogare 100 µl di campione diluito nei relativi pozzetti. Se possibile, analizzare i campioni in duplicato, sebbene sia accettabile anche l'analisi in un singolo pozzetto.

- 5 Coprire i pozzetti e incubarli a 18–26°C per 60 minuti (\pm 5 minuti).

- 6 Rimuovere il contenuto liquido di tutti i pozzetti e lavare ciascun pozzetto con circa 300 µl di soluzione di lavaggio per 3–5 volte. Evitare di lasciare asciugare la piastra tra un lavaggio e l'altro e prima di aggiungere altro reagente. Dopo l'ultima rimozione, picchiettare con decisione il liquido di lavaggio residuo presente in ciascuna piastra su materiale assorbente.

- 7 Erogare 100 µl di coniugato in ciascun pozzetto.

- 8 Coprire i pozzetti e incubarli a 18–26°C per 30 minuti (\pm 2 minuti).

- 9 Ripetere il passaggio 6.

- 10 Erogare 100 µl di substrato TMB in ciascun pozzetto.

- 11 Coprire i pozzetti e incubarli a 18–26°C per 15 minuti (\pm 1 minuto).

- 12 Erogare 100 µl di soluzione di arresto in ciascun pozzetto.

- 13 Misurare e annotare i valori di assorbanza a 450nm, A(450).

14 Calcolo:

Controllos

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450) + CP2 A(450)}{2}$$

Criteri di validità

$$CN\bar{x} \leq 0,200$$

$$CP\bar{x} \geq 0,300$$

Nel caso di esami non validi, la tecnica è da sospettarsi e l'esame deve essere ripetuto seguendo attentamente l'insero tecnico.

Campioni

$$C/P = \frac{\text{Campione A(450)} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$$

La presenza o l'assenza di anticorpi contro *M. bovis* viene determinata calcolando il rapporto tra campione e controllo positivo (C/P) per ciascun campione.

15 Interpretazione:

Negativi

$$C/P < 0,30$$

Positivo

$$C/P \geq 0,30$$

Nota: IDEXX offre strumenti e software in grado di calcolare i risultati e di fornire riepiloghi dei risultati.

Limiti di utilizzo

Un risultato negativo non esclude la possibilità di un'infezione da *M. bovis*. Gli anticorpi contro *M. bovis* possono essere transitori o possono svilupparsi in uno stadio avanzato dell'infezione; inoltre, non tutti gli animali infetti mostrano una sierconversione. Un risultato positivo indica la presenza di anticorpi contro *M. bovis* nell'animale esaminato. A causa della potenziale esposizione e risposta alla presenza di *Mycobacteria* nell'ambiente (ad esempio, *M. kansasii*), quando si classifica un animale o una mandria è necessario considerare tutti i risultati dei test per la tubercolosi (risposta cutanea, presenza di gamma interferone e test ELISA per la ricerca di anticorpi) insieme all'anamnesi della mandria. Il test non è adatto a diagnosticare singoli animali o mandrie come liberi dalla malattia.

Certificazione OIE

Sommario degli Studi di convalida

Fare riferimento al registro www.oie.int dei test diagnostici per informazioni descrittive complete

Caratteristiche analitiche

Precisione: CV piastra (densità ottica del campione negativo) = da 14,5% a 17,7%

CV piastra (densità ottica del positivo debole) = da 8,7% a 11,9%

CV piastra (densità ottica del positivo moderato) = da 5,7% a 10,3%

Ripetibilità: Da piastra a piastra (valore C/P del campione equivoco) = da 18% a 27%

Da piastra a piastra (valore C/P del campione positivo) = da 12% a 21%

Specificità analitica:

I dati indicano che il kit è molto specifico per quanto riguarda altre componenti micobatteriche ambientali (ad esempio *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*). Gli isolamenti *M. kansasii* sono rari, ma l'infezione con (alte dosi) di *M. kansasii* potrebbe comportare risultati positivi falsi, sottolineando i limiti dei test di screening basati sulle proteine conservate tra le specie micobatteriche.

Sensibilità analitica: non applicabile

Caratteristiche diagnostiche

Determinazione del cut-off

Il cut-off C/P del test (rapporto campione/positivo) di 0,30 è stato determinato prendendo in considerazione la specificità del test complessiva al 97%-98% durante lo sviluppo.

Stime della sensibilità diagnostica (DSn) e della specificità (DSp)

I livelli di prestazione indicati in basso si basano su 3 diversi lotti ELISA prodotti con significativa diversità biologica, per quanto riguarda i componenti del kit.

Risultati di ELISA *M. bovis* messi a confronto con lo stato positivo della coltura e con campioni provenienti da mandrie o regioni prive di TB.

Metodo in corso di valutazione	IDEXX <i>M. bovis</i> Antibody ELISA	Specie target (Bestiame)
Sensibilità diagnostica (utilizzando positivi di coltura <i>M. bovis</i>)	N	307
	DSn	(64,6%)
	CI	(59,7% - 69,5%)
Specificità diagnostica (campioni da aree prive di TB)	N	1473
	DSp	(98%)
	CI	(97,5% - 98,4%)

Prestazioni comparative

Il livello di sensibilità indicato in basso si basa su 3 diversi lotti ELISA prodotti con significativa diversità biologica, per quanto riguarda i componenti del kit. I dati della specificità rappresentano soltanto un lotto ELISA.

Risultati ELISA *M. bovis* messi a confronto con risultati positivi e negativi del test della tubercolina cervicale comparativa intradermica singola (Single Intradermal Comparative Cervical Tuberculin, SICCT).

Metodo di confronto	IDEXX <i>M. bovis</i> Antibody ELISA	Specie target (bestiame)
Sensibilità diagnostica (rispetto a SICCT)	N	344
	DSn	(69,5%)
	CI	(64,4% - 74,1%)
Specificità diagnostica (rispetto a SICCT)	N	144
	DSp	(97,2%)
	CI	(92,8% - 99,1%)

Risultati ELISA *M. bovis* a confronto con positivi gamma interferone (GIFN).

Metodo di confronto	IDEXX <i>M. bovis</i> Antibody ELISA	Specie target (bestiame)
Sensibilità diagnostica (rispetto a IFN Gamma)	N	166
	DSn	(62,7%)
	CI	(64,4% - 74,1%)
Specificità diagnostica (rispetto a IFN Gamma)	N	Nessun confronto diretto eseguito sui negativi Gamma ricavati da mandrie negative
	DSp	
	CI	

Accordo e discrepanze

La natura delle analisi per la TB (classificazione basata sull'ispezione visiva della macellazione, successo relativo con coltura e differenze tra cellulosa-mediata [GIFN e SICCT] e risposte umorali) ha generato, come previsto, un grande numero di discrepanze. Le discrepanze sono indicative della natura complessa della TB bovina e sottolineano l'importanza dell'applicazione di strumenti diagnostici multipli per poter ottenere un quadro più completo dell'infezione. Anche se sono state rilevate discrepanze significative tra i vari metodi, i dati mostrano la maggiore sensibilità che può essere ottenuta tramite l'impiego strategico dei sottoinsiemi di rilevamento di veri positivi non riscontrati tramite altri metodi.

Riproducibilità

Un pannello di campioni caratterizzati (n=30) e lotti distinti sono stati forniti a 2 laboratori al fine di poter stabilire la riproducibilità a livello dell'utente finale. Ciascun laboratorio ha testato il pannello, in duplicato, senza supervisione, su ciascuno dei tre lotti forniti.

Il pannello ha compreso un totale di 30 campioni (10 negativi e 20 positivi). È stato raggiunto un accordo del 100% tra i lotti presso ciascuna delle 3 sedi (comprese le prove effettuate alla IDEXX).

Riferimenti bibliografici

1. de la Rúa-Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen, and R. S. Clifton-Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81:190-210.
2. Coad, M., Downs, S.H., Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G. Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2008. *The Veterinary Record.* 162: 382-384.
3. Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T. McGill, K., Collins, J.D. 2006. *Vet. Microbiol.* 112, 171-179.
4. Palmer, M. V., Waters, W. R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112, 181-190.

Assistenza tecnica:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contattare il responsabile di zona o il distributore IDEXX o consultare il sito: idexx.com/contact/pdre

IDEXX e Test With Confidence sono un marchio di proprietà di, e/o registrato da, IDEXX Laboratories, Inc. o dei suoi affiliati e protetti negli Stati Uniti e/o in altri paesi.

© 2015 IDEXX Laboratories, Inc. Tutti i diritti sono riservati.

WARNING / ATTENTION / ATENCIÓN / ATENÇÃO / ACHTUNG / ATTENZIONE



H319 / P280 / P337+P313

Sample Diluent – Causes serious eye irritation. Wear eye protection. If eye irritation persists: Get medical advice / attention.

Diluant des échantillons – Provoque une sévère irritation des yeux. Porter un équipement de protection des yeux. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

Diluyente de Amostra – Provoca irritação ocular grave. Usar protecção ocular. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

Diluyente de la Muestra – Provoca irritación ocular grave. Llevar gafas de protección. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

Probenverdünnungspuffer – Verursacht schwere Augenreizung. Augenschutz tragen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Diluyente del campione – Provoca grave irritazione oculare. Indossare proteggere gli occhi. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

H315 / H319 / P280 / P332+P313 / P337+P313

TMB Substrate – Causes skin irritation. Causes serious eye irritation. Wear protective gloves / eye protection / face protection. If skin irritation occurs: Get medical advice / attention. If eye irritation persists: Get medical advice / attention.

Substrat TMB – Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Porter des gants de protection / un équipement de protection des yeux / du visage. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

Substrato TMB – Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de protecção / protecção ocular / protecção facial. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

TMB-Substrat – Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Substrato TMB – Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Indossare guanti / Proteggere gli occhi / il viso. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

Stop solution – Causes mild skin irritation. May cause an allergic skin reaction. If skin irritation or rash occurs: Get medical advice / attention. Wash contaminated clothing before reuse.

Solution d'arrêt – Provoque une légère irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.


Solução de Interrupção – Causa uma irritação suave da pele. Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar.

Solución de Frenado – Provoca una leve irritación cutánea. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas.

Stopplösung – Verursacht milde Hautreizungen. Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.

Soluzione di arresto – Provoca delicato irritazione della pelle. Può provocare una reazione allergica cutanea. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente.

Symbol Descriptions / Descriptions des symboles / Descrições do símbolos Descripciones de los símbolos / Symbol-Beschreibungen / Descrizione dei simboli

	Batch Code (Lot) / Numéro de lot / Código de lote (Lote) Número de Partida (Lote) / Chargenbezeichnung (Ch.-B.) / Codice del lotto (partita)
	Serial Number / Numéro de série / Número de série Número de serie / Seriennummer / Numero di serie
	Catalog Number / Numéro de catalogue / Número de catálogo Número de catálogo / Katalognummer / Numero di catalogo
	In vitro diagnostic / Diagnostic in vitro / Diagnóstico in-vitro Diagnóstico in-vitro / In-vitro-Diagnostikum / Diagnostico in vitro
	Authorized Representative in the European Community Représentant agréé pour la Communauté européenne Representante autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Autorisierte EG-Vertretung Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Positive Control / Contrôle positif / Controle Positivo Control Positivo / Positive Kontrolle / Controllo Positivo
	Negative Control / Contrôle négatif / Controle Negativo Control Negativo / Negative Kontrolle / Controllo Negativo
	Use by date / À utiliser avant la date / Data de Vencimento Usar antes de / Verwendbar bis / Usare entro
	Date of manufacture / Date de fabrication / Data de Fabricação Fecha de fabricación / Herstellungsdatum / Data di produzione
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante Fabricante/ Hersteller / Ditta produttrice
	Temperature limitation / Limite de température Limite de temperatura / Limite de temperatura Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura
	Consult instructions for use / Consulter la notice d'utilisation Consulte instruções para o uso / Consultar las instrucciones de uso Gebrauchsinformation beachten / Consultare le istruzioni per l'uso
	Major change in the user instructions Modification majeure du mode d'emploi Modificações importante nas instruções de uso Modificación importante en el manual de instrucciones Wesentliche Änderung der Gebrauchsinformation Modifica importante nell'inserto tecnico

Manufacturer
IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092
USA

EU-Representative
IDEXX Europe B.V.
P.O. Box 1334
2130 EK Hoofddorp
The Netherlands

idexx.com

IDEXX