

**Indirect Immunofluorescence Test for detection of  
*Taylorella equigenitalis***

**Test de détection de *Taylorella equigenitalis* par  
Immunofluorescence Indirecte**

**Immunofluorescencia indirecta para detecção do  
*Taylorella equigenitalis***

USO VETERINÁRIO

**Immunofluorescencia indirecta para la detección de  
*Taylorella equigenitalis***

**Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis von  
*Taylorella equigenitalis***



Validated and certified by the OIE as fit for the purposes defined in the kit insert. Registration number 20160111.

Pourquier\* **IFI *Taylorella equigenitalis***

06-01410-06

Test With Confidence™

**IDEXX**



## Indirect Immunofluorescence Test for detection of *Taylorella equigenitalis*

For veterinary use only.

### Name and Intended Use

Pourquier\* IFI *Taylorella equigenitalis* is IDEXX's pool of monoclonal antibodies for the detection of *Taylorella equigenitalis* in genital swabs using immunofluorescence technique.



### OIE Statement

The validation data for this kit have been certified by the OIE, based on expert review, as fit for the following purposes:

1. Certify freedom from infection or agent in individual animals or products for trade or movement purposes.
2. Estimate prevalence of infection to facilitate risk analysis (surveys, herd health schemes or disease control).
3. Control of infection in stallions and mares at the start of the breeding season.

### Descriptions and Principles

Pourquier\* IFI *Taylorella equigenitalis* uses the principle of immunofluorescence technique.

The swabs are fixed on slides with an acetone bath. The fixed swabs are placed in contact with the pool of monoclonal antibodies to allow bindings. A conjugate F(ab)'2 mouse anti-Immunoglobulin labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) is fixed on the monoclonal antibodies. The presence of *Taylorella equigenitalis* is demonstrated by observing the bacterial bodies presenting a typical fluorescence on cell wall, with a non fluorescent center. It shows no cross-reactivity with the following germs: *Actinobacillus equuli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella pneumonia*.

### Reagents

### Volume

	Reagents	Volume
1	Pool of monoclonal antibodies (3B6 1, 3B6 11, 7B7, 7C4)	1 x 1.2 mL
2	Conjugate (anti-mouse F(ab)'2 fragment affinity isolated FITC conjugate, diluted in Evans blue dye)	1 x 1.2 mL

**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 all reagents away from light at  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  until the expiry date or up to 2 months at  $2-8^{\circ}\text{C}$ .  
Reagents are stable until expiration date, provided they have been stored properly.

## Materials Required but Not Provided

- Phosphate buffer pH 7.2: the user can use any current formulation of phosphate buffer (without Ca<sup>2+</sup> nor Mg<sup>2+</sup>). The fluorescence of the antibody conjugated with the FITC is optimal when the pH is slightly alkaline, pH 7.2.
- Glycerol
- Acetone
- Precision Micropipettes and Multi-dispensing micropipettes
- Disposable pipette tips
- Humid chamber capable of maintaining a temperature of +37°C (±3°C)
- Dry incubator capable of maintaining a temperature of +37°C (±3°C)

## 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.
- 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.

## Preparation of Reagents

### Buffered glycerin, 9 volumes

Mix 1 volume of Phosphate buffer pH 7.2 with 9 volumes of glycerol.

## Preparation of Samples

### Genital swabs

Each swab is wiped by direct rotation on the slide being careful to avoid contamination between samples. Dry the slides in a dry incubator at +37°C (±3°C) for a minimum of 30 minutes. Fix the slides by immersion in a pure acetone bath at +20°C for 15 minutes.

## Test Procedure

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

- 1 Dispense 30  $\mu$ l / spot of Pool of anti-Taylorella monoclonal antibodies.

---
- 2 Incubate for 30 minutes at +37°C ( $\pm$ 3°C) in a humid chamber.

---
- 3 Rinse the slides using a wash bottle with a trickle of phosphate buffer pH 7.2.

---
- 4 Immerse them in a phosphate buffer bath, agitate with a magnetic rod for 15 minutes.

---
- 5 Rinse the slides using a wash bottle with a trickle of distilled water.  
**Note:** this last wash in distilled water is intended to prevent the formation of salt crystals resulting from the evaporation of the phosphate buffer.

---
- 6 Dry for 15 minutes in a dry incubator at +37°C ( $\pm$ 3°C).

---
- 7 Dispense 30  $\mu$ l / spot of Conjugate.

---
- 8 Incubate for 30 minutes at +37°C ( $\pm$ 3°C) in a humid chamber.

---
- 9 Rinse the slides using a wash bottle with a trickle of phosphate buffer pH 7.2.

---
- 10 Immerse them in a phosphate buffer bath, agitate with a magnetic rod for 15 minutes.

---
- 11 Rinse the slides using a wash bottle with a trickle of distilled water.  
**Note:** this last wash in distilled water is intended to prevent the formation of salt crystals resulting from the evaporation of the phosphate buffer.

---
- 12 Dry for 15 minutes in a dry incubator at +37°C ( $\pm$ 3°C).  
**Note:** the slide can be stored in the freezer at temperature  $\leq$  -16°C for later reading.

---
- 13 Set the slide with the buffered glycerin.

---
- 14 Read with a fluorescent microscope with an amplification of 40x and 100x.

## Interpretation of Results

The presence of *Taylorella equigenitalis* is demonstrated by observing the bacterial bodies presenting a typical fluorescence on cell wall, with a non fluorescent center.



## Summary of validation studies

### Analytical characteristics

Repeatability: results comparable with the culture method for special agar with and without charcoal.

Analytical specificity: 100%

The tests are based on negative results of 18 pure cultures of bacterial strains other than *T. equigenitalis* which could be isolated from equine genital tract, 44 field isolates and one collection strain (CIP 107673T) of *T. asinigenitalis*.

Analytical sensitivity: 100%.

The tests are based on the detection of all 706 pure cultures of field isolates of *T. equigenitalis* (506 field isolates from France and 200 field isolates from Holland) and 4 *T. equigenitalis* reference strains (NCTC 11225, ATCC 35865, ERC 7810381 and ERC 78107419).

The limit of detection (LOD) was evaluated in comparison with two culture methods (chocolate agar and selective Agar) in a mixture of *T. equigenitalis* and *Streptococcus zooepidemicus* in two different transport media (Amies with and without charcoal). The LOD of IFI was slightly superior in transport medium without charcoal (dilution 1/130000 vs. 1/120000) and in comparison with the culture method IFI was slightly superior to chocolate agar medium (dilution 1/130000 vs. 1/100000) and slightly inferior to selective agar culture medium (dilution 1/130000 vs. 1/150000).

### Diagnostic characteristics

Diagnostic sensitivity (DSn) and specificity (DSp) estimates:

A. Field validation performed by OIE Reference Laboratory Netherlands (CVI Lelystad)

#### 1) Validation based on individual horses

In the CVI validation study, from 730 horses tested, 12 horses were found positive by both culture and IDEXX IFI method. DSn and DSp of IDEXX IFI kit on individual horses considering culture as gold standard test:

<u>Test method under evaluation</u>	<u>IDEXX IFI</u>	<u>Target Species (Equine)</u>
Diagnostic sensitivity (Isolation and identification)	N DSn CI	12 (100%) 95% confidence interval: 73.5%-100%
Diagnostic specificity (Isolation and identification)	N DSp CI	718 (97.2%) 95% confidence interval: 95.7%-98.2%

#### 2) Validation based on individual samples

A total of 2019 samples were tested by CVI and 1953 samples were found negative by both culture and IDEXX IFI test. The culture method yielded 19 positive samples and IFI method detected 65 samples as positive DSn and DSp of IDEXX IFI kit on individual samples considering culture as gold standard test:

<u>Test method under evaluation</u>	<u>IDEXX IFI</u>	<u>Target Species (Equine)</u>
Diagnostic sensitivity (Isolation and identification)	N DSn CI	19 (94.7%) 95% confidence interval: 73.9%-99.8%
Diagnostic specificity (Isolation and identification)	N DSp CI	2000 (97.6%) 95% confidence interval: 96.8%-98.2%

## B. Field validation performed in case of non-experienced operator

In the field validation, from 2019 samples tested, 3 samples were found positive by culture and negative by IDEXX IFI test. These 3 samples were examined a second time by the same operators and in two slides specific *Taylorella equigenitalis* elements were found. The discordant results between the first reading and the re-examination of these 2 slides are explained by an error of non-experienced operators who did not detect the specific *Taylorella equigenitalis* elements at the routine examination of slides. Because of the fact that selective re-examination of samples (discordant or discordance analysis) induces a bias in estimates of sensitivity and specificity, we calculate the DS<sub>n</sub> and DS<sub>p</sub> of the field validation after the first reading of slides. In this particular case, because of the low number of positive animals, the diagnostic sensitivity drops from 94% to 84% for individual samples and from 100% to 83% for individual horses.

### **1) Validation based on individual horses**

DS<sub>n</sub> and DS<sub>p</sub> of IDEXX IFI kit on individual horses considering culture as gold standard test (non-experienced operator):

<u>Test method under evaluation</u>	<u>IDEXX IFI</u>	<u>Target Species (Equine)</u>
Diagnostic sensitivity (Isolation and identification)	N DS <sub>n</sub> CI	12 (100%) 95% confidence interval: 73.5%-100%
Diagnostic specificity (Isolation and identification)	N DS <sub>p</sub> CI	718 (97.2%) 95% confidence interval: 95.7%-98.2%

### **2) Validation on individual samples**

DS<sub>n</sub> and DS<sub>p</sub> of IDEXX IFI kit on individual samples considering culture as gold standard test (non-experienced operator):

<u>Test method under evaluation</u>	<u>IDEXX IFI</u>	<u>Target Species (Equine)</u>
Diagnostic sensitivity (Isolation and identification)	N DS <sub>n</sub> CI	19 (84.2%) 95% confidence interval: 60.4%-96.6%
Diagnostic specificity (Isolation and identification)	N DS <sub>p</sub> CI	2000 (97.5%) 95% confidence interval: 96.7%-98.1%

### **Comparative performance:**

Field validation performed by OIE Reference Laboratory Netherlands (CVI Lelystad) on individual samples.

All samples found positive by either culture or IFI were tested by PCR. From 22 individual samples found positive by PCR, 21 were positive by IFI DS<sub>n</sub> of IDEXX IFI on individual samples considering PCR as gold standard test.

## Reproducibility

ANSES Dozulé (France) participates in some ring trials organized by one of the OIE laboratories for CEM (Animal Health Veterinary Laboratories Agency, GB). During the last session of June 2012 (report from the AHVLA dated July 6, 2012), the IDEXX IFI kit was used in parallel with the requested technique, bacteriology and PCR and ANSES obtained a 100% agreement with the requested technique.

The IDEXX kit was utilised for the ring trial in 2013 by 18 laboratories and in 2014 by 36 laboratories:

- In 2013 from 18 laboratories, 17 detected correctly all 6 positive swabs of the panel and one did not detect the highly diluted weak positive sample (100% correctly detected positive swabs).
- In 2014 from 36 laboratories, 34 detected correctly all 7 positive swabs of the panel and two laboratories did not detect the highly diluted weak positive sample (100% correctly detected positive swabs).

These results demonstrate a good reproducibility of the test to accurately detect the target organism even in a mixed bacterial flora which could be present in the reproductive tract of a mare and stallion.

For more details see the file “Ring trial for MCE by IFI: ANSES report 2013-2014.

## Applications

2019 samples from 730 horses were tested with IDEXX IFI kit by CVI (Netherland) within the national screening program: export purposes (414 horses), screening (215 horses), certification artificial insemination service (91 horses) or for other reasons e.g. research/confirmation (10 horses).

In France, the IDEXX IFI kit has been used since 2013 principally for screening of stallions and mares at the start of breeding season (obligatory for “pure sang” and “trotteur français” races) and the movement of animals. All positive IFI animals should be confirmed by culture.

## References

DA Gradinaru et al: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taylorella equigenitalis*, Vet Res (1997) 28, 65-76.

## 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](http://idexx.com/contactlpd)

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

© 2017 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.



## Test de détection de *Taylorella equigenitalis* par Immunofluorescence Indirecte

Réservé à l'usage vétérinaire.

### Définition et application

Pourquier\* IFI *Taylorella equigenitalis* est un mélange d'anticorps monoclonaux IDEXX destiné à la détection de *Taylorella equigenitalis* sur des frottis génitaux (écouvillons) par la technique d'immunofluorescence indirecte.



### Communiqué de l'OIE

Les données de validation pour ce kit ont été certifiées par l'OIE, sur la base d'un examen d'experts, comme étant approprié aux objectifs suivants:

1. Certifier l'absence de l'infection ou de l'agent pathogène chez des animaux individuels ou des marchandises à des fins d'échanges ou de mouvements internationaux.
2. Estimer la prévalence de l'infection, afin de faciliter l'analyse du risque (enquêtes, programmes sanitaires à l'échelle des troupeaux ou lutte contre les maladies).
3. Dépistage des étalons et des poulinières au début de la saison de monte.

### Description et principe

Pourquier\* IFI *Taylorella equigenitalis* utilise le principe la technique d'immunofluorescence indirecte. Les frottis sont fixés sur la lame par un bain d'acétone. Les frottis fixés sont mis en contact avec ce mélange d'anticorps monoclonaux qui s'y fixe spécifiquement. Un conjugué F(ab)'2 antiimmunoglobulines de souris marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) se fixe sur les anticorps monoclonaux. La présence de *Taylorella equigenitalis* se traduit par l'observation de corps bactériens présentant une fluorescence typique sur leur bordure. Il ne présente pas de réaction croisée avec les germes suivants: *Actinobacillus equuli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* et *Klebsiella pneumoniae*.

### Réactifs

### Volume

	Réactifs	Volume
1	Mélange d'anticorps monoclonaux (mélange de 4 anticorps: 3B6 1, 3B6 11, 7B7, 7C4)	1 x 1,2 ml
2	Conjugué (conjugué F(ab)'2 anti-immunoglobulines de souris marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dilué dans du Bleu Evans)	1 x 1,2 ml

**Note:** 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 l'abri de la lumière à une température  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la date de péremption ou jusqu'à 2 mois à  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Les réactifs sont stables jusqu'à leur date de péremption à condition d'être conservés correctement.

## Matériel nécessaire mais non fourni

- Tampon phosphate pH 7,2: L'utilisateur peut utiliser tout tampon phosphate de formulation courante (sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ). La fluorescence des anticorps conjugués à la FITC est maximale lorsque le pH est légèrement alcalin, pH 7.2.
- Glycérol
- Acétone
- Pipettes de précision ou pipettes multicanaux
- Embouts de pipettes à usage unique
- Chambre humide capable de maintenir une température de  $+37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ )
- Etuve sèche capable de maintenir une température de  $+37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ )

## 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.
- 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.

## Préparation des réactifs

### Glycérine tamponnée

Mélanger 1 volume de Tampon phosphate pH 7,2 avec 9 volumes de Glycérol.

## Préparation des échantillons

### Écouvillons

Chaque écouvillon est essuyé par rotation directement sur la lame en prenant soin d'éviter les contaminations inter-échantillons. Sécher les lames à l'étuve sèche à  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) pendant minimum 30 minutes. Fixer les lames par immersion dans un bain d'acétone pur pendant 15 minutes à  $+20^{\circ}\text{C}$ .

## Mode opératoire

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

- 1 Déposer 30  $\mu$ l / spot d'anticorps anti-Taylorella.

---

- 2 Incuber 30 minutes à +37°C ( $\pm$ 3°C) en chambre humide.

---

- 3 Rincer les lames par un filet de Tampon phosphate (pH 7,2) à l'aide d'une pissette.

---

- 4 Les immerger dans un bain de Tampon phosphate sous agitation avec un barreau aimanté pendant 15 minutes.

---

- 5 Rincer les lames par un filet d'eau distillée à l'aide d'une pissette.  
**Note:** Ce dernier lavage en eau distillée est destiné à éviter la formation de cristaux de sels résultant de l'évaporation du reliquat de Tampon phosphate.

---

- 6 Laisser sécher 15 minutes à l'étuve sèche à +37°C ( $\pm$ 3°C).

---

- 7 Déposer 30  $\mu$ l / spot de Conjugué.

---

- 8 Incuber 30 minutes à +37°C ( $\pm$ 3°C) en chambre humide.

---

- 9 Rincer les lames par un filet de Tampon phosphate à l'aide d'une pissette.

---

- 10 Les immerger dans un bain de Tampon phosphate sous agitation avec un barreau aimanté pendant 15 minutes.

---

- 11 Rincer les lames par un filet d'eau distillée à l'aide d'une pissette.  
**Note:** Ce dernier lavage en eau distillée est destiné à éviter la formation de cristaux de sels résultant de l'évaporation du reliquat de Tampon phosphate.

---

- 12 Laisser sécher 15 minutes à l'étuve sèche à +37°C ( $\pm$ 3°C).  
**Note:** la lame peut être conservée au congélateur à une température  $\leq$  -16°C pour lecture ultérieure.

---

- 13 Monter la lame avec la glycérine tamponnée.

---

- 14 Procéder à la lecture au microscope à fluorescence au grossissement 40x puis 100x.

## Interprétation

La présence de *Taylorella equigenitalis* se traduit par l'observation de corps bactériens présentant une fluorescence typique sur leur bordure.



## Résumé des études de validation

### Caractéristiques analytiques

Répétabilité: résultats comparables avec la méthode de culture sur gélose spéciale avec et sans charbon.

Spécificité analytique: 100%

Les tests sont basés sur les résultats négatifs obtenus avec 18 cultures pures de souches bactériennes autres que *T. equigenitalis* qui ont pu être isolées à partir des voies génitales équine, 44 isolats de terrain et une souche de prélèvement (CIP 107673T) de *T. asinigenitalis*.

Sensibilité analytique: 100%

Les tests sont basés sur la détection de toutes les 706 cultures pures des isolats de terrain de *T. equigenitalis* (506 isolats de terrain provenant de France et 200 isolats de terrain provenant de Hollande) et 4 souches de référence de *T. equigenitalis* (NCTC 11225, ATCC 35865, ERC 7810381 et ERC 78107419).

La limite de détection (LD) a été évaluée en comparaison avec deux méthodes de culture (gélose chocolat et gélose sélective) dans un mélange de *T. equigenitalis* et de *Streptococcus zooepidemicus* dans deux milieux de transport différents (milieu Amies avec et sans charbon). La LD par IFI (immunofluorescence indirecte) était légèrement supérieure dans le milieu de transport sans charbon (dilution 1/130 000 vs 1/120 000); dans une comparaison avec la méthode de culture, l'IFI était légèrement supérieure à un milieu de culture sur gélose chocolat (dilution 1/130 000 vs 1/100 000) et légèrement inférieure à un milieu de culture sur gélose sélective (dilution 1/130 000 vs 1/150 000).

### Caractéristiques diagnostiques

Estimations de la sensibilité diagnostique (SnD) et de la spécificité diagnostique (SpD):

A. Validation de terrain effectuée par le laboratoire de référence de l'OIE aux Pays-Bas (CVI Lelystad)

#### 1) Validation basée sur des chevaux individuels

Dans l'étude de validation du CVI, sur les 730 chevaux testés, 12 chevaux ont été trouvés positifs aussi bien en culture que par la méthode IDEXX IFI. SnD et SpD du kit IDEXX IFI sur des chevaux individuels, en considérant la culture comme le test de référence:

Méthode de test évaluée	IDEXX IFI	Espèce cible (cheval)
Sensibilité diagnostique (isolation et identification)	N SnD IC	12 (100%) Intervalles de confiance de 95%: 73.5%-100%
Spécificité diagnostique (isolation et identification)	N SpD IC	718 (97.2%) Intervalles de confiance de 95%: 95.7%-98.2%

#### 2) Validation basée sur des échantillons individuels

Un total de 2 019 échantillons ont été analysés par le CVI et 1 953 échantillons ont été trouvés négatifs aussi bien en culture que par le test IDEXX IFI. La méthode de culture a détecté 19 échantillons positifs, tandis que la méthode IFI a détecté 65 échantillons comme étant positifs. SnD et SpD du kit IDEXX IFI sur des échantillons individuels en considérant la culture comme le test de référence:

Méthode de test évaluée	IDEXX IFI	Espèce cible (cheval)
Sensibilité diagnostique (isolation et identification)	N SnD IC	19 (94,7%) Intervalles de confiance de 95% 73,9%-99,8%
Spécificité diagnostique (isolation et identification)	N SpD IC	2 000 (97,6%) Intervalles de confiance de 95% 96,8%-98,2%

## B. Validation de terrain effectuée dans le cas d'un opérateur non expérimenté

Dans la validation de terrain, sur les 2019 échantillons analysés, 3 échantillons ont été trouvés positifs par la culture et négatifs par le test IDEXX IFI. Ces 3 échantillons ont été examinés une deuxième fois par les mêmes opérateurs et, sur deux lames, des éléments spécifiques de *Taylorella equigenitalis* ont été trouvés. Les résultats discordants entre la première lecture et le nouvel examen de ces 2 lames sont expliqués par une erreur des opérateurs non expérimentés, qui n'ont pas détecté les éléments spécifiques de *Taylorella equigenitalis* lors de l'examen de routine des lames. Compte tenu du fait que le réexamen sélectif des échantillons (analyse en cas d'incohérence ou de discordance) induit un biais dans les estimations de sensibilité et de spécificité, nous calculons la SnD et la SpD de la validation de terrain après la première lecture des lames. Dans ce cas particulier, à cause du faible nombre d'animaux positifs, la sensibilité diagnostique chute de 94% à 84% pour les échantillons individuels et de 100% à 83% pour les chevaux individuels.

### **1) Validation basée sur des chevaux individuels**

SnD et SpD du kit IDEXX IFI sur des chevaux individuels, en considérant la culture comme le test de référence (opérateur non expérimenté):

<u>Méthode de test évaluée</u>	<u>IDEXX IFI</u>	<u>Espèce cible (cheval)</u>
Sensibilité diagnostique (isolation et identification)	N SnD IC	12 (100%) Intervalles de confiance de 95% 73,5%-100%
Spécificité diagnostique (isolation et identification)	N SpD IC	718 (97,2%) Intervalles de confiance de 95% 95,7%-98,2%

### **2) Validation sur des échantillons individuels**

SnD et SpD du kit IDEXX IFI sur des échantillons individuels, en considérant la culture comme le test de référence (opérateur non expérimenté):

<u>Méthode de test évaluée</u>	<u>IDEXX IFI</u>	<u>Espèce cible (cheval)</u>
Sensibilité diagnostique (isolation et identification)	N SnD IC	19 (84,2%) Intervalles de confiance de 95% 60,4%-96,6%
Spécificité diagnostique (isolation et identification)	N SpD IC	2000 (97,5%) Intervalles de confiance de 95% 96,7%-98,1%

### **Performance comparative:**

Validation de terrain effectuée par le laboratoire de référence de l'OIE aux Pays-Bas (CVI Lelystad) sur des échantillons individuels.

Tous les échantillons trouvés positifs soit en culture, soit avec le test IFI, ont été analysés par PCR. Sur les 22 échantillons individuels trouvés positifs par PCR, 21 étaient positifs avec le test IFI. SnD du test IDEXX IFI sur des échantillons individuels en considérant la PCR comme le test de référence.

## Reproductibilité

L'ANSES, le laboratoire de pathologie équine de Dozulé (France), participe à certains essais circulaires organisés par l'un des laboratoires de l'OIE pour la métrite contagieuse équine (MCE) (Animal Health Veterinary Laboratories Agency, GB). Pendant la dernière session de juin 2012 (rapport de l'AHVLA daté du 6 juillet 2012), le kit IDEXX IFI a été utilisé en parallèle avec la technique demandée, la bactériologie et la PCR. L'ANSES a obtenu un accord de 100% avec la technique demandée.

Le kit IDEXX a été utilisé pour l'essai circulaire en 2013 par 18 laboratoires et en 2014 par 36 laboratoires:

- En 2013, sur les 18 laboratoires, 17 ont correctement détecté tous les 6 écouvillons positifs du panel et un laboratoire n'a pas détecté l'échantillon faiblement positif hautement dilué (100% ont correctement détecté les écouvillons positifs).
- En 2014, sur les 36 laboratoires, 34 ont correctement détecté tous les 7 écouvillons positifs du panel et deux laboratoires n'ont pas détecté l'échantillon faiblement positif hautement dilué (100% ont correctement détecté les écouvillons positifs).

Ces résultats démontrent une bonne reproductibilité du test pour détecter avec précision l'organisme cible, même au sein d'une flore bactérienne mélangée qui pourrait se trouver dans l'appareil génital d'une jument et d'un étalon.

Pour plus de détails, voir le document: « Ring trial for CEM by IIF: ANSES report 2013-2014 » (Essai circulaire pour la détection de la MCE par IFI: rapport de l'ANSES 2013-2014).

## Applications

2019 échantillons de 730 chevaux ont été analysés avec le kit IDEXX IFI par le CVI (Pays-Bas) dans le cadre d'un programme national de dépistage: aux fins d'exportation (414 chevaux), de dépistage (215 chevaux), de certification de service d'insémination artificielle (91 chevaux) ou pour d'autres raisons, telles que la recherche ou la confirmation (10 chevaux).

En France, le kit IDEXX IFI est utilisé depuis 2013, principalement pour le dépistage des étalons et des juments au début de la saison de reproduction (obligatoire pour les races « pur sang » et « trotteur français ») et pour le déplacement des animaux. Tous les résultats positifs par IFI pour les animaux doivent être confirmés par culture.

## Références

DA Gradinaru et al: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taylorella equigenitalis*, Vet Res (1997) 28, 65-76.

## 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](http://idexx.com/contactlpd)

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.

© 2017 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

## Inmunofluorescencia indirecta para detecção do *Taylorella equigenitalis*

Para uso exclusivamente veterinário.

### Nome e Indicações

Pourquier\* IFI *Taylorella equigenitalis* é um pool de anticorpos monoclonais destina-se à detecção do *Taylorella equigenitalis* em swabs genitais com o uso da técnica Inmunofluorescencia indirecta.



### Declaração da OIE

Os dados de validação deste kit foram certificados pela OIE, com base em análises de especialistas, como adequados para as seguintes finalidades:

1. Certificar a ausência de infecção ou agentes em animais ou produtos individuais para fins de comercialização ou movimentação.
2. Estimar a prevalência de infecção para facilitar a análise de risco (pesquisas, esquemas de saúde do rebanho ou controle de doenças).
3. Controle da infecção em garanhões e éguas no início da época de reprodução.

### Descrição e Princípios

Pourquier\* IFI *Taylorella equigenitalis* utiliza o princípio da técnica de imunofluorescência. Os swabs são fixados em lâminas com um banho de acetona. Os swabs fixados são colocados em contato com um pool de anticorpos monoclonais para permitir ligações. Um conjugado de F (ab) '2 anti-imunoglobulina de rato marcado com isothiocyanato fluoresceína (FITC) é fixada sobre os anticorpos monoclonais. A presença de *Taylorella equigenitalis* é demonstrada pela observação dos corpos bacterianos que apresentam uma fluorescência típica na parede celular com um centro não fluorescente. Ele não revela reatividade cruzada com os seguintes germes: *Actinobacillus equuli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *asteurella haemolytica*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Klebsiella pneumoniae*.

### Reagentes

### Volume

	Reagentes	Volume
1	Pool de anticorpos monoclonais (Pool de 4 anticorpos: 3B6 1, 3B6 11, 7B7, 7C4)	1 x 1,2 ml
2	Conjugado (conjugado FITC isolado com afinidade pela fração F(ab)'2 anti-rato" pronto para uso, diluído em azul de Evans)	1 x 1,2 ml

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

## Armazenagem

Conservar os reagentes protegido da luz a  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  até a data de expiração ou 2 meses a  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Os reagentes são estáveis até a data de validade, desde que sejam devidamente conservados.

## Materiais Necessários, mas Não Fornecidos

- Tampão de fosfato pH 7.2: O usuário pode usar qualquer formulação corrente de tampão de fosfato (sem  $\text{Ca}^{2+}$  nem  $\text{Mg}^{2+}$ ). A fluorescência do anticorpo conjugado com o FITC é ideal quando o pH for um pouco alcalino, pH 7.2.
- Glicerol
- Acetona
- Micropipetas de precisão e micropipetas multicanal
- Ponteiras de pipetas descartáveis
- Incubadora úmida a  $+37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ )
- Incubadora seca a  $+37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ )

## Precauções e Advertências

- Manipular todos os materiais biológicos como potencialmente infectantes.
- Usar luvas de proteção / vestuário / proteção para os olhos ou face 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.
- 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.

## Preparo das reagentes

### Glicerina tamponada, 9 volumes

Misture 1 volume do Tampão de fosfato pH 7.2 com 9 volumes do Glicerol.

## Preparo das Amostras

### Swabs

Através da rotação direta, passar cada swab na lâmina, tomando cuidado para evitar a contaminação entre as amostras. Secar as lâminas em uma incubadora seca a  $+37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) por no mínimo 30 minutos. Fixar as lâminas através da imersão em um banho de acetona pura a  $+20^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.



## Procedimento de Teste

Todos os reagentes devem ser mantidos a 18–26°C antes da utilização. Misturar reagentes invertendo suavemente ou realizando movimentos circulares.

- 1 Dispensar 30  $\mu$ l /local de Pool de anti-corpos monoclonais de *Taylorella*.

---

- 2 Incubar por 30 minutos a +37°C ( $\pm$ 3°C) em incubadora úmida.

---

- 3 Lave as lâminas usando um frasco de lavagem com um pingo de tampão de fosfato pH 7.2.

---

- 4 Imergi-las em banho de tampão de fosfato, agitar com uma haste magnética por 15 minutos.

---

- 5 Enxaguar as lâminas usando frasco de lavagem com um pingo de água destilada.  
**Nota:** Esta última lavagem em água destilada serve para evitar a formação de cristais de sal produzidos pela evaporação do tampão de fosfato.

---

- 6 Secar por 15 minutos em uma incubadora seca a +37°C ( $\pm$ 3°C).

---

- 7 Dispense 30  $\mu$ l / local de conjugado.

---

- 8 Incubar por 30 minutos a +37°C ( $\pm$ 3°C) em incubadora húmida.

---

- 9 Lave as lâminas usando um frasco de lavagem com um pingo de tampão de fosfato pH 7.2.

---

- 10 Imergi-las em banho de tampão de fosfato, agitar com uma haste magnética por 15 minutos.

---

- 11 Enxaguar as lâminas usando frasco de lavagem com um pingo de água destilada.  
**Nota:** Esta última lavagem em água destilada serve para evitar a formação de cristais de sal produzidos pela evaporação do tampão de fosfato.

---

- 12 Secar por 15 minutos em uma incubadora seca a +37°C ( $\pm$ 3°C).  
**Nota:** as lâminas podem ser armazenadas em temperatura de congelamento  $\leq$  -16°C para uma leitura posterior.

---

- 13 Ajuste as laminas com um tampão de glicerina.

---

- 14 Ler com um microscópio fluorescente com uma amplificação de 40x e 100x

## Interpretação de Resultados

A presença do *Taylorella equigenitalis* é demonstrada através da observação dos corpos bacterianos que apresentam uma fluorescência característica na parede da célula com um núcleo não-fluorescente.



## Resumo dos estudos de validação

### Características analíticas

Repetibilidade: resultados comparáveis com o método de cultura para ágar especial com e sem carvão.

Especificidade analítica: 100%

Os testes são baseados em resultados negativos de 18 culturas puras de cepas bacterianas, além de *T. equigenitalis*, que puderam ser isoladas do trato genital equino, 44 isolados de campo e uma cepa de coleta (CIP 107673T) de *T. asinigenitalis*.

Sensibilidade analítica: 100%

Os testes são baseados na detecção de todas as 706 culturas puras de isolados de campo de *T. equigenitalis* (506 isolados de campo da França e 200 isolados de campo da Holanda) e 4 cepas de referência de *T. equigenitalis* (NCTC 11225, ATCC 35865, ERC 7810381 e ERC 78107419).

O limite de detecção (LOD, limit of detection) foi avaliado em comparação com dois métodos de cultura (ágar chocolate e ágar seletivo) em uma mistura de *T. equigenitalis* e *Streptococcus zooepidemicus* em dois diferentes meios de transporte (Amies com e sem carvão). O LOD do IIF foi ligeiramente superior no meio de transporte sem carvão (diluição 1/130000 vs. 1/120000) e, em comparação com o método de cultura, o IIF foi ligeiramente superior ao meio de ágar chocolate (diluição 1/130000 vs. 1/100000), e ligeiramente inferior ao meio de cultura ágar seletivo (diluição 1/130000 vs. 1/150000).

### Características diagnósticas

Estimativas da sensibilidade (DSn) e especificidade diagnóstica (DSp):

#### A. Validação de campo realizada pelo OIE Reference Laboratory da Holanda (CVI Lelystad)

##### 1) Validação baseada em cavalos individuais

No estudo de validação do CVI (Content Validity Index - Índice de Validação de Conteúdo), de 730 cavalos testados, 12 apresentaram resultado positivo pela cultura e pelo método IDEXX IIF. DSn e DSp do kit IDEXX IIF em cavalos individuais, considerando a cultura como o teste padrão ouro:

Método de teste em avaliação	IDEXX IIF	Espécie-alvo (equina)
Sensibilidade diagnóstica (Isolamento e identificação)	N DSn IC	12 (100%) Intervalo de confiança de 95%: 73,5%-100%
Especificidade diagnóstica (Isolamento e identificação)	N DSp IC	718 (97,2%) Intervalo de confiança de 95%: 95,7%-98,2%

##### 2) Validação baseada em amostras individuais

Foram analisadas, no total, 2019 amostras por CVI e 1953 apresentaram resultado negativo pelo teste de cultura e pelo IDEXX IIF. O método de cultura forneceu 19 amostras positivas e o método IIF detectou 65 amostras como DSn e DSp positivas do kit IDEXX IIF em cavalos individuais, considerando a cultura como o teste padrão ouro:

Método de teste em avaliação	IDEXX IIF	Espécie-alvo (equina)
Sensibilidade diagnóstica (Isolamento e identificação)	N DSn IC	19 (94,7%) Intervalo de confiança de 95%: 73,9%-99,8%
Especificidade diagnóstica (Isolamento e identificação)	N DSp IC	2000 (97,6%) Intervalo de confiança de 95%: 96,8%-98,2%

## B. Validação de campo realizada em caso de operador inexperiente

Na validação de campo, das 2019 amostras testadas, 3 apresentaram resultado positivo por cultura e negativo pelo teste IDEXX IIF. Essas três amostras foram examinadas uma segunda vez pelos mesmos operadores e, em duas lâminas, foram encontrados elementos específicos de *Taylorella equigenitalis*. Os resultados discordantes entre a primeira leitura e o reexame dessas duas lâminas são explicados por um erro de operadores inexperientes que não detectaram os elementos específicos de *Taylorella equigenitalis* no exame de rotina das lâminas. Devido ao fato de que o reexame seletivo das amostras (análise discrepante ou de discordância) induz um viés nas estimativas de sensibilidade e especificidade, calculamos a DSn e a DSp da validação de campo após a primeira leitura das lâminas. Nesse caso específico, devido ao baixo número de animais positivos, a sensibilidade diagnóstica cai de 94% a 84% para amostras individuais e de 100% a 83% para cavalos individuais.

### **1) Validação baseada em cavalos individuais**

DSn e DSp do kit IDEXX IIF em cavalos individuais, considerando a cultura como o teste padrão ouro (operador inexperiente):

<u>Método de teste em avaliação</u>	<u>IDEXX IIF</u>	<u>Espécie-alvo (equina)</u>
Sensibilidade diagnóstica (Isolamento e identificação)	N DSn IC	12 (100%) Intervalo de confiança de 95%: 73,5%-100%
Especificidade diagnóstica (Isolamento e identificação)	N DSp IC	718 (97,2%) Intervalo de confiança de 95%: 95,7%-98,2%

### **2) Validação em amostras individuais**

DSn e DSp do kit IDEXX IIF em amostras individuais, considerando a cultura como o teste padrão ouro (operador inexperiente):

<u>Método de teste em avaliação</u>	<u>IDEXX IIF</u>	<u>Espécie-alvo (equina)</u>
Sensibilidade diagnóstica (Isolamento e identificação)	N DSn IC	19 (84,2%) Intervalo de confiança de 95%: 60,4%-96,6%
Especificidade diagnóstica (Isolamento e identificação)	N DSp IC	2000 (97,5%) Intervalo de confiança de 95%: 96,7%-98,1%

### **Desempenho comparativo:**

Validação de campo realizada pelo OIE Reference Laboratory da Holanda (CVI Lelystad) em amostras individuais

Todas as amostras positivas por cultura ou IIF foram testadas por PCR. De 22 amostras individuais positivas por PCR, 21 foram positivas pela DSn de IIF do IDEXX IIF em amostras individuais, considerando PCR o teste padrão ouro.

## Reprodutibilidade

A ANSES em Dozulé (França) participa de alguns estudos clínicos interlaboratoriais organizado por um dos laboratórios da OIE para Contagious Equine Metritis (CEM) (Animal Health Veterinary Laboratories Agency - AHVLA, Grã Bretanha). Durante a última sessão de junho de 2012 (relatório da AHVLA datado de 6 de julho de 2012), o kit IDEXX IIF foi usado em paralelo com a técnica solicitada, bacteriologia e PCR, e a ANSES obteve uma concordância de 100% com a técnica solicitada.

O kit IDEXX foi utilizado para o estudo clínico interlaboratorial em 2013 por 18 laboratórios e, em 2014, por 36 laboratórios:

- Em 2013, de 18 laboratórios, 17 detectaram corretamente todos os 6 swabs positivos do painel e um não detectou a amostra fraca positiva altamente diluída (100% de swabs positivos corretamente detectados).
- Em 2013, de 18 laboratórios, 17 detectaram corretamente todos os 6 swabs positivos do painel e um não detectou a amostra fraca positiva altamente diluída (100% de swabs positivos corretamente detectados).

Esses resultados demonstram uma boa reprodutibilidade do teste em detectar com precisão o organismo-alvo mesmo em uma flora bacteriana mista que pode estar presente no trato reprodutor de uma égua e de um garanhão.

Esses resultados demonstram uma boa reprodutibilidade do teste em detectar com precisão o organismo-alvo mesmo em uma flora bacteriana mista que pode estar presente no trato reprodutor de uma égua e de um garanhão.

## Aplicações

2019 amostras de 730 cavalos foram testadas com o kit IDEXX IIF pelo CVI (Holanda) dentro do programa nacional de triagem: para fins de exportação (414 cavalos), triagem (215 cavalos), serviço de certificação de inseminação artificial (91 cavalos) ou por outros motivos, p. ex., pesquisa/confirmação (10 cavalos).

Na França, o kit IDEXX IIF tem sido usado desde 2013, principalmente para triagem de garanhões e éguas no início da época de reprodução (obrigatoriamente para raças "puro sangue" e "trotador francês") e para a movimentação de animais. Todos os animais positivos no IIF devem ser confirmados por cultura.

## Referências

DA Gradinaru et al: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taylorella equigenitalis*, Vet Res (1997) 28, 65-76.

## Para assistência técnica:

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

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contate o representante local ou distribuidor IDEXX ou visite: [idexx.com/contactipd](http://idexx.com/contactipd)

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.

© 2017 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.

## Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de *Taylorella equigenitalis*

Para uso veterinario exclusivo.

### Nombre y uso propuesto

Pourquier\* IFI *Taylorella equigenitalis* es una mezcla de anticuerpos monoclonales para la detección de *Taylorella equigenitalis* en isopos genitales aplicando la técnica de inmunofluorescencia indirecta.



### Declaración OIE

Los datos de validación de este kit han sido certificados por la OIE, tras un examen por expertos, como adecuados para los fines siguientes:

1. Certificar la ausencia de infección o del agente patógeno en cada animal o en los productos con fines de intercambios comerciales o de desplazamientos;
2. Estimar la prevalencia de la infección para facilitar el análisis del riesgo (encuestas, programas sanitarios en los rebaños o control de enfermedades);
3. Control de la infección en sementales y yeguas al inicio de la temporada de reproducción.

### Descripción y principios

La prueba Pourquier\* IFI *Taylorella equigenitalis* usa la técnica de la inmunofluorescencia. Se fijan los isopos en portaobjetos con un baño de acetona. Los frotis fijados se ponen en contacto con la mezcla de anticuerpos monoclonales que los fija de modo específico. Un conjugado F(ab)'2 anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se fija a los anticuerpos monoclonales. La presencia de *Taylorella equigenitalis* se pone de manifiesto observando los cuerpos bacterianos, que muestran una fluorescencia característica en su pared celular, con un centro no fluorescente. No presenta reactividad cruzada con los gérmenes siguientes: *Actinobacillus equuli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Klebsiella pneumoniae*.

### Reactivos

### Volumen

	Reactivos	Volumen
1	Mezcla de anticuerpos monoclonales (mezcla de 4 anticuerpos: 3B6 1, 3B6 11, 7B7 y 7C4)	1 x 1,2 ml
2	Conjugado ("conjugado F (ab)'2 anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)" diluido en el colorante azul de Evans)	1 x 1,2 ml

**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 alejados de la luz a una temperatura  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  hasta la fecha de vencimiento o 2 meses a  $2-8^{\circ}\text{C}$ . 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**

- Solución tampón fosfato pH 7,2: el usuario puede emplear cualquiera de las formulaciones actuales de solución tampón fosfato (sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ). La fluorescencia del anticuerpo conjugado con FITC resulta óptima con un pH ligeramente alcalino, pH 7,2.
- Glicerol
- Acetona
- Pipetas de precisión o pipetas multicanal
- Puntas de pipetas desechables
- Cámara húmeda capaz de mantener una temperatura de  $+37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ )
- Incubadora seca capaz de mantener una temperatura de  $+37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ )

## **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.
- 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.

## **Preparación de los reactivos**

### **Glicerina tamponada, 9 volúmenes**

Mezclar 1 volumen de Solución tampón fosfato pH 7,2 con 9 volúmenes de Glicerol.

## **Preparación de las muestras**

### **Frotis**

Aplicar cada isopo mediante rotación directa en el portaobjetos, procurando evitar la contaminación entre las muestras. Secar los portaobjetos en una incubadora seca a  $+37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos como mínimo. Fijar los portaobjetos mediante inmersión en un baño de acetona pura a  $+20^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

## 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 Depositar 30  $\mu$ l / punto de anticuerpos anti-Taylorella.

---

- 2 Incubar durante 30 minutos a +37°C ( $\pm$ 3°C) en una cámara húmeda.

---

- 3 Lavar los portaobjetos con un chorro de solución tampón fosfato usando una botella de lavado.

---

- 4 Sumergir los portaobjetos en un baño de solución tampón fosfato pH 7,2 y agitar con una varilla magnética durante 15 minutos.

---

- 5 Enjuagar los portaobjetos con un chorro de agua destilada usando una botella de lavado.  
**Nota:** con este último lavado con agua destilada se pretende evitar la formación de cristales de sal debidos a la evaporación de la solución tampón fosfato.

---

- 6 Secar durante 15 minutos a +37°C ( $\pm$ 3°C) en una incubadora seca.

---

- 7 Depositar 30  $\mu$ l / punto de conjugado.

---

- 8 Incubar durante 30 minutos a +37°C ( $\pm$ 3°C) en una cámara húmeda.

---

- 9 Lavar los portaobjetos con un chorro de solución tampón fosfato usando una botella de lavado.

---

- 10 Sumergir los portaobjetos en un baño de solución tampón fosfato y agitar con una varilla magnética durante 15 minutos.

---

- 11 Enjuagar los portaobjetos con un chorro de agua destilada usando una botella de lavado.  
**Nota:** con este último lavado con agua destilada se pretende evitar la formación de cristales de sal debidos a la evaporación de la solución tampón fosfato.

---

- 12 Secar durante 15 minutos a +37°C ( $\pm$ 3°C) en una incubadora seca.  
**Nota:** el portaobjetos se puede conservar en el congelador a una temperatura  $\leq$  -16°C para su posterior lectura.

---

- 13 Preparar los portaobjetos con la glicerina tamponada.

---

- 14 Leer con un microscopio de fluorescencia con una amplificación de 40 y 100 aumentos.

## Interpretación de los resultados

La presencia de *Taylorella equigenitalis* se pone de manifiesto observando los cuerpos bacterianos, que muestran una fluorescencia característica en su pared celular, con un centro no fluorescente.



## Resumen de los estudios de validación

### Características del análisis

Repetibilidad: resultados comparables con el método de cultivo agar especial con y sin carbón.

Especificidad Analítica: 100%

Las pruebas se basan en resultados negativos de 18 cultivos puros de cepas bacterianas distintas a *T. equigenitalis* y que se pudieron aislar en vías genitales equinas, 44 muestras de campo y una cepa de colección (CIP 107673T) de *T. asinigenitalis*.

Sensibilidad Analítica: 100%.

Las pruebas se basan en la detección de 706 cultivos puros de muestras de campo de *T. equigenitalis* (506 muestras de campo de Francia y 200 muestras de campo de Holanda) y 4 cepas de referencia de *T. equigenitalis* (NCTC 11225, ATCC 35865, ERC 7810381 y ERC 78107419).

El límite de detección (LdD) se evaluó en comparación con dos métodos de cultivo (agar chocolate y agar selectivo) en una mezcla de *T. equigenitalis* y *Streptococcus zooepidemicus* en dos medios de transporte distintos (Amies con y sin carbón). El LdD de la prueba IFI fue ligeramente superior en un medio de transporte sin carbón (dilución 1/130000 y 1/120000) y, en comparación con el método de cultivo, el valor de la prueba IFI fue ligeramente superior en un medio de agar chocolate (dilución 1/130000 y 1/100000) y ligeramente inferior para el medio de cultivo de agar selectivo (dilución 1/130000 y 1/150000).

### Características de diagnóstico

Cálculos de especificidad diagnóstica (DSp) y sensibilidad diagnóstica (DSn):

A. Validación de campo realizada por el Laboratorio de Referencia de la OIE en los Países Bajos (CVI Lelystad)

#### 1) Validación basada en caballos individuales

En el estudio de validación de CVI, de 730 caballos examinados, se obtuvieron resultados positivos en 12 de ellos, tanto con el método IFI de IDEXX como con el método de cultivo. Valores de DS<sub>n</sub> y DS<sub>p</sub> del método IFI de IDEXX en caballos individuales tomando el cultivo como la prueba de referencia:

Análisis evaluado	IFI de IDEXX	Especie diana (equino)
Sensibilidad diagnóstica (Aislamiento e identificación)	N DS <sub>n</sub> CI	12 (100%) Intervalo de confianza del 95%: 73,5%-100%
Especificidad diagnóstica (Aislamiento e identificación)	N DS <sub>p</sub> CI	718 (97.2%) Intervalo de confianza del 95%: 95,7%-98,2%

#### 2) Validación basada en muestras individuales

El CVI estudió en total 2019 muestras y obtuvo resultados negativos en 1953 de ellas, tanto con la prueba IFI de IDEXX como con el cultivo. Con el cultivo se obtuvieron 19 muestras positivas, mientras que con la prueba IFI se detectaron 65 muestras positivas. Valores de DS<sub>n</sub> y DS<sub>p</sub> de la prueba IFI de IDEXX en muestras individuales tomando el cultivo como prueba de referencia:

Método de análisis evaluado	IFI de IDEXX	Especie diana (equino)
Sensibilidad diagnóstica (Aislamiento e identificación)	N DS <sub>n</sub> CI	19 (94.7%) Intervalo de confianza del 95%: 73,9%-99,8%
Especificidad diagnóstica (Aislamiento e identificación)	N DS <sub>p</sub> CI	2000 (97.6%) Intervalo de confianza del 95%: 96,8%-98,2%



## B. Validación de campo realizada por un operador sin experiencia

En la validación de campo, de 2019 muestras estudiadas, 3 dieron positivas con el cultivo y negativas con la prueba IFI de IDEXX. En esas 3 muestras se realizó un segundo examen por los mismos operadores; en 2 placas se encontraron elementos específicos de *Taylorella equigenitalis*. Los resultados discordantes entre la primera lectura y el nuevo análisis de esas 2 placas se explicaron como un error por parte de los operadores sin experiencia, que no detectaron los elementos específicos de *Taylorella equigenitalis* en el examen de rutina de las placas. Dado que un segundo análisis selectivo de las muestras (análisis de discordancia o discrepante) ocasiona un sesgo en los cálculos de sensibilidad y especificidad, los valores de DS<sub>n</sub> y DS<sub>p</sub> de la validación de campo se calculan después de la primera lectura de las placas. En este caso en concreto, dado el bajo número de animales positivos, la sensibilidad diagnóstica se reduce del 94% al 84% para muestras individuales, y del 100% al 83% para caballos individuales.

### **1) Validación basada en caballos individuales**

Valores de DS<sub>n</sub> y DS<sub>p</sub> del kit IFI de IDEXX en caballos individuales tomando el cultivo como la prueba de referencia (operador sin experiencia):

<u>Método de análisis evaluado</u>	<u>IFI de IDEXX</u>	<u>Especie diana (equino)</u>
Sensibilidad diagnóstica (Aislamiento e identificación)	N DS <sub>n</sub> CI	12 (100%) Intervalo de confianza del 95%: 73,5%-100%
Especificidad diagnóstica (Aislamiento e identificación)	N DS <sub>p</sub> CI	718 (97,2%) Intervalo de confianza del 95%: 95,7%-98,2%

### **2) Validación en muestras individuales**

Valores de DS<sub>n</sub> y DS<sub>p</sub> de la prueba IFI de IDEXX en muestras individuales tomando el cultivo como prueba de referencia (operador sin experiencia):

<u>Método de análisis evaluado</u>	<u>IFI de IDEXX</u>	<u>Especie diana (equino)</u>
Sensibilidad diagnóstica (Aislamiento e identificación)	N DS <sub>n</sub> CI	19 (84,2%) Intervalo de confianza del 95%: 60,4%-96,6%
Especificidad diagnóstica (Aislamiento e identificación)	N DS <sub>p</sub> CI	2000 (97,5%) Intervalo de confianza del 95%: 96,7%-98,1%

### **Rendimiento comparativo:**

Validación de campo realizada por el Laboratorio de Referencia de la OIE en los Países Bajos (CVI Lelystad) en muestras individuales

Todas las muestras encontradas positivas bien por cultivo o por la prueba IFI fueron analizadas mediante PCR. De un total de 22 muestras individuales, 21 resultaron positivas con la prueba IFI. DS<sub>n</sub> de la prueba IFI de IDEXX en muestras individuales, tomando PCR como prueba de referencia.

## Reproducibilidad

ANSES, laboratorio de patología equina de Dozulé (Francia), participa en algunos ensayos interlaboratoriales organizados por laboratorios de la OIE para la metritis contagiosa equina (MCE) (Animal Health Veterinary Laboratories Agency, Reino Unido). Durante la última sesión de junio de 2012 (informe de la AHVLA con fecha 6 de julio de 2012), la prueba IFI de IDEXX se utilizó en combinación con la técnica solicitada, bacteriología, PCR. ANSES obtuvo una coincidencia del 100% con la técnica solicitada.

El kit IDEXX se utilizó para el ensayo interlaboratorio de 2013 en 18 laboratorios y en 36 laboratorios en el ensayo de 2014:

- En 2013, 17 de los 18 laboratorios detectaron correctamente las 6 muestras positivas del panel y un laboratorio no detectó la muestra positiva débil altamente diluida (100% de isopos positivos detectados correctamente).
- En 2014, 34 de los 36 laboratorios detectaron correctamente las 7 muestras positivas del panel y dos laboratorios no detectaron la muestra positiva débil altamente diluida (100% de isopos positivos detectados correctamente).

Estos resultados demuestran una buena reproducibilidad de la prueba para detectar con exactitud el organismo diana incluso con presencia de flora bacteriana mixta en el tracto reproductivo de una yegua o de un semental.

Para obtener más información, consulte el archivo “Ring trial for MCE by IIF: ANSES report 2013-2014”.

## Aplicaciones

2019 muestras de 730 caballos se examinaron con la prueba IFI de IDEXX en el CVI (Países Bajos) en el marco del programa de selección nacional: selección con fines de exportación (414 caballos), monitorización (215 caballos), certificación del servicio de inseminación artificial (91 caballos) u otros fines, como investigación/confirmación (10 caballos). En Francia, la prueba IFI de IDEXX se utiliza desde 2013, principalmente para la selección de sementales y yeguas al comienzo de la temporada de cría (obligatorio para las razas “pure sang” y “trotteur français”) y el desplazamiento de animales. Todos los resultados positivos por la prueba IFI en animales deben confirmarse mediante cultivo.

## Referencias

DA Gradinaru et al: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taylorella equigenitalis*, Vet Res (1997) 28, 65-76.

## 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](http://idexx.com/contactlpd)

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.

© 2017 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

## Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis von *Taylorella equigenitalis*

Gebrauchsinformation. In-vitro-Diagnostikum. Nur zum tierärztlichen Gebrauch.

### Name und Verwendungszweck

Pourquier\* IFI *Taylorella equigenitalis* ist eine Mischung aus monoklonalen Antikörpern zum Nachweis von *Taylorella equigenitalis* auf Tupferabstrichen mittels indirekter Immunfluoreszenz.



### OIE-Erklärung

Die validierten Daten für dieses Kit wurden von der OIE zertifiziert und sind laut Sachverständigengutachten für folgende Zwecke geeignet:

1. Zertifizierung, dass für den Handel oder Transport bestimmte individuelle Tiere oder Produkte frei von Infektion bzw. Erregern sind.
2. Schätzung der Infektionsprävalenz zur Ermöglichung einer Risikoanalyse (Befragungen, Herdengesundheitspläne oder Krankheitskontrolle).
3. Infektionskontrolle bei Hengsten und Stuten zu Beginn der Zuchtsaison.

### Beschreibung des Testprinzips

Pourquier\* IFI *Taylorella equigenitalis* wendet das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz an. Die Abstriche werden mittels Acetonbad auf den Objektträgern fixiert. Die fixierten Abstriche werden mit der Mischung aus monoklonalen Antikörpern in Berührung gebracht, wobei es zu einer spezifischen Bindung der Antikörper an die Antigene kommt. Ein mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiertes F(ab)'2 -Konjugat aus Anti-Immunglobulinen der Maus bindet an die monoklonalen Antikörper. Die Anwesenheit von *Taylorella equigenitalis* zeigt sich durch den Nachweis von Bakterienkörpern mit typisch fluoreszierenden Rändern. Es kommt zu keiner Kreuzreaktion mit folgenden Erregern: *Actinobacillus equuli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* und *Klebsiella pneumoniae*.

### Reagenzien

### Menge

	Reagenzien	Menge
1	Mischung aus monoklonalen Antikörpern (Mischung aus 4 Antikörpern: 3B6 1, 3B6 11, 7B7, 7C4)	1 x 1,2 ml
2	Konjugat (mit in Evansblau verdünntem Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiertes F(ab)'2-Konjugat aus Anti-Immunglobulinen der Maus)	1 x 1,2 ml

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

### Lagerung

Reagenzien unter Lichtausschluss bei einer Temperatur von  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  bis zum Verfalldatum lagern oder bis zu 2 Monaten bei  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Bei entsprechender Lagerung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum stabil.

## **Notwendiges Material, das nicht mitgeliefert wird**

- Phosphatpuffer pH 7.2: Es kann jeder Phosphatpuffer in gängiger Zusammensetzung (der weder  $\text{Ca}^{2+}$  noch  $\text{Mg}^{2+}$  enthält) verwendet werden. Die an FITC-Konjugat gebundenen Antikörper erreichen ihre maximale Fluoreszenz bei einem leicht alkalischen pH-Wert von 7.2
- Glycerol
- Aceton
- Präzisionspipetten und Multikanalmikropipetten
- Einweg-Pipettenspitzen
- Trockenkammer bei  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ )
- Feuchtkammer bei  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ )

## **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.
- 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.

## **Vorbereitung der Reagenzien**

### **Gepuffertes Glycerol, 9 Teile**

Einen Volumenanteil Phosphatpuffer pH 7.2 mit 9 Volumenanteilen Glycerol verdünnen.

## **Vorbereitung der Proben**

### **Genitalabstrichtupfer**

Jeder Tupfer wird mit einer Drehbewegung direkt auf dem Objektträger abgewischt. Dabei eine Kontamination innerhalb der Proben vermeiden. Die Objektträger in einer Trockenkammer bei  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) 30 Min. trocknen. Die Objektträger durch Eintauchen in ein reines Acetonbad 15 Min. bei  $+20^{\circ}\text{C}$  fixieren.

## Testanweisung

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

- 1 30 µl / Spot des Anti-Taylorella Antikörpers aufbringen.

---
- 2 30 Min. bei 37°C (±3°C) in der Feuchtkammer inkubieren.

---
- 3 Die Objektträger mit einem Strahl des Phosphatpuffers aus einer Waschflasche reinigen.

---
- 4 Die Objektträger anschließend 15 Min. und unter Rühren mittels eines Magnetstabs in ein Phosphatpufferbad eintauchen.

---
- 5 Die Objektträger mit einem Strahl destilliertem Wasser aus einer Waschflasche reinigen.  
**Anmerkung:** Dieser letzte Waschvorgang mit destilliertem Wasser ist dazu bestimmt der Bildung von Salzkristallen vorzubeugen, welche durch die Verdunstung des restlichen Phosphatpuffers entstehen.

---
- 6 15 Min. in der Trockenkammer bei 37°C (±3°C) trocknen lassen.

---
- 7 30 µl / Spot des Konjugats auftragen.

---
- 8 30 Min. bei 37°C (±3°C) in der Feuchtkammer inkubieren.

---
- 9 Die Objektträger mit einem Strahl des Phosphatpuffers pH 7.2 aus einer Waschflasche reinigen.

---
- 10 Die Objektträger anschließend 15 Min. und unter Rühren mittels eines Magnetstabs in ein Phosphatpufferbad eintauchen.

---
- 11 Die Objektträger mit einem Strahl destilliertem Wasser aus einer Waschflasche reinigen.  
**Anmerkung:** Der letzte Waschvorgang mit destilliertem Wasser ist dazu bestimmt der Bildung von Salzkristallen vorzubeugen, welche durch die Verdunstung des restlichen Phosphatpuffers entstehen.

---
- 12 15 Min. in der Trockenkammer bei 37°C (±3°C) trocknen lassen.  
**Anmerkung:** Der Objektträger kann für eine spätere Messung im Tiefkühlschrank bei einer Temperatur von weniger oder gleich -16° C aufbewahrt werden.

---
- 13 Den Objektträger mit dem gepufferten Glycerol in das Mikroskop einsetzen.

---
- 14 Die Messung mit dem Fluoreszenzmikroskop erst bei 40-facher und dann bei 100-facher Vergrößerung durchführen.

## Interpretation der Ergebnisse

Die Anwesenheit von *Taylorella equigenitalis* zeigt sich durch den Nachweis von Bakterienkörpern mit typisch fluoreszierenden Rändern.



## Zusammenfassung der Validierungsstudien

### Analytische Merkmale

Reproduzierbarkeit: Ergebnisse sind vergleichbar mit der Kulturmethode für spezielles Agarmedium mit und ohne Aktivkohle.

Analytische Spezifität: 100%

Die Tests basieren auf den negativen Ergebnissen von 18 Reinkulturen von Bakterienstämmen von *T. equigenitalis*, die aus dem equinen Genitaltrakt isoliert werden konnten, 44 Feldisolaten und einen Referenzstamm (CIP 107673T) von *T. asinigenitalis*.

Analytische Sensitivität: 100%

Die Tests basieren auf der Detektion aller 706 Reinkulturen der Feldisolate von *T. equigenitalis* (506 Feldisolate aus Frankreich und 200 Feldisolate aus Holland) und 4 *T. equigenitalis* Referenzstämmen (NCTC 11225, ATCC 35865, ERC 7810381 und ERC 78107419).

Die Nachweisgrenze (LOD) wurde im Vergleich mit zwei Kulturmethoden (Kochblutagar und selektivem Agar) in einem Gemisch von *T. equigenitalis* und *Streptococcus zooepidemicus* in zwei verschiedenen Transportmedien (Amies mit und ohne Aktivkohle) beurteilt. Die Nachweisgrenze war bei IFI im Transportmedium mit Aktivkohle leicht überlegen (Verdünnung 1/130000 ggü. 1/120000); im Vergleich zur Kulturmethode war IFI dem Kochblutagarmedium leicht überlegen (Verdünnung 1/130000 ggü. 1/100000); und im Vergleich zum selektiven Agarkulturmedium leicht unterlegen (Verdünnung 1/130000 ggü. 1/150000).

### Diagnostische Merkmale

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

A. Die Feldvalidierung wurde vom OIE Reference Laboratory Netherlands (CVI Lelystad) durchgeführt

#### 1) Validierung basierend auf individuellen Pferden

In der CVI-Validierungsstudie wurden 730 Pferde getestet, 12 davon hatten sowohl mit der Kultur als auch mit der IDEXX IFI-Methode einen positiven Befund. DSn und DSp des IDEXX IFI-Kits bei individuellen Pferden, wobei die Kultur als Goldstandardtest galt:

<u>Beurteilte Testmethode</u>	<u>IDEXX IFI</u>	<u>Zielspezies (Pferd)</u>
Diagnostische Sensitivität (Isolation und Identifikation)	N DSn CI	12 (100%) 95% Konfidenzintervall: 73,5% - 100%
Diagnostische Spezifität (Isolation und Identifikation)	N DSp CI	718 (97.2%) 95% Konfidenzintervall: 95,7% - 98,2%

#### 2) Validierung basierend auf individuellen Proben

Es wurden insgesamt 2019 Proben durch CVI getestet und 1953 Proben hatten sowohl in der Kultur als auch im IDEXX IFI-Test einen negativen Befund. Die Kulturmethode ergab 19 positive Proben und die IFI-Methode erkannte bei 65 Proben einen positiven Befund DSn und DSp des IDEXX IFI-Kits bei individuellen Proben unter Berücksichtigung der Kultur als Goldstandardtest:

<u>Beurteilte Testmethode</u>	<u>IDEXX IFI</u>	<u>Zielspezies (Pferd)</u>
Diagnostische Sensitivität (Isolation und Identifikation)	N DSn CI	19 (94.7%) 95% Konfidenzintervall: 73,9% - 99,8%
Diagnostische Spezifität (Isolation und Identifikation)	N DSp CI	2000 (97.6%) 95% Konfidenzintervall: 96,8% - 98,2%

## B. Feldvalidierung aufgrund eines unerfahrenen Anwenders

In der Feldvalidierung wurden aus den 2019 getesteten Proben 3 Proben in der Kultur positiv und im IDEXX IFI-Test negativ beurteilt. Diese 3 Proben wurden vom gleichen Anwender ein zweites Mal untersucht und auf zwei Testplättchen wurden spezifische *Taylorella equigenitalis*-Elemente gefunden.

Die abweichenden Ergebnisse der ersten und zweiten Ablesung dieser 2 Testplättchen wird auf einen Fehler des unerfahrenen Anwenders zurückgeführt, der die spezifischen *Taylorella equigenitalis*-Elemente bei der routinemäßigen Untersuchung der Testplättchen nicht erkannte. Da die selektive erneute Untersuchung der Proben (Nichtübereinstimmungs- oder Abweichungsanalyse) die Schätzungen der Sensitivität und Spezifität beeinflusst, haben wir DS<sub>n</sub> und DS<sub>p</sub> der Feldvalidierung nach der ersten Ablesung der Testplättchen berechnet. In diesem Fall senkte sich die diagnostische Sensitivität aufgrund der geringen Anzahl positiver Tiere von 94% auf 84% bei den individuellen Proben und von 100% auf 83% bei den individuellen Pferden.

### **1) Validierung basierend auf individuellen Pferden**

DS<sub>n</sub> und DS<sub>p</sub> des IDEXX IFI-Kits bei individuellen Pferden, wobei die Kultur als Goldstandardtest galt (unerfahrener Anwender):

<u>Beurteilte Testmethode</u>	<u>IDEXX IFI</u>	<u>Zielspezies (Pferd)</u>
Diagnostische Sensitivität (Isolation und Identifikation)	N DS <sub>n</sub> CI	12 (100%) 95% Konfidenzintervall: 73,5% - 100%
Diagnostische Spezifität (Isolation und Identifikation)	N DS <sub>p</sub> CI	718 (97.2%) 95% Konfidenzintervall: 95,7% - 98,2%

### **2) Validierung basierend auf individuellen Proben**

DS<sub>n</sub> und DS<sub>p</sub> des IDEXX IFI-Kits bei individuellen Proben, wobei die Kultur als Goldstandardtest galt (unerfahrener Anwender):

<u>Beurteilte Testmethode</u>	<u>IDEXX IFI</u>	<u>Zielspezies (Pferd)</u>
Diagnostische Sensitivität (Isolation und Identifikation)	N DS <sub>n</sub> CI	19 (84.2%) 95% Konfidenzintervall: 60.4%-96.6%
Diagnostische Spezifität (Isolation und Identifikation)	N DS <sub>p</sub> CI	2000 (97.5%) 95% Konfidenzintervall: 96.7%-98.1%

### **Vergleichbare Leistung:**

Die Feldvalidierung wurde vom OIE Reference Laboratory Netherlands (CVI Lelystad) an individuellen Proben durchgeführt

Alle in der Kultur oder im IFI als positiv befundenen Proben wurden mittels PCR geprüft. Von 22 individuellen Proben, die im PCR als positiv befunden wurden, waren 21 im IFI DS<sub>n</sub> des IDEXX IFI-Tests an individuellen Proben positiv, wobei der PCR als Goldstandardtest galt.

## Reproduzierbarkeit

ANSES Dozulé (Frankreich) nahm an einigen der von den OIE Laboratorien für CEM (Animal Health Veterinary Laboratories Agency, GB) organisierten Ringstudien teil. In der letzten Sitzung im Juni 2012 (Bericht von der AHVLA vom 6. Juli 2012) wurde das IDEXX IFI-Kit parallel zur angeforderten Testmethode, Bakteriologie und PCR verwendet und ANSES konnte eine 100%-ige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der angeforderten Methode bestätigen.

Das IDEXX-Kit wurde für die 2013 durchgeführte Ringstudie an 18 Laboratorien und 2014 an 36 Laboratorien verwendet:

- 2013 erkannten 17 von den 18 Laboratorien alle 6 positiven Probenutpfer der Testreihe und ein Labor konnte den positiven Tupfer aufgrund der hochverdünnten schwach-positiven Probe nicht erkennen (100% korrekt erkannte positive Probenutpfer).
- 2014 erkannten 34 von den 36 Laboratorien alle 7 positiven Probenutpfer der Testreihe und zwei Laboratorien konnten den positiven Tupfer aufgrund der hochverdünnten schwach-positiven Probe nicht erkennen (100% korrekt erkannte positive Probenutpfer).

Diese Ergebnisse liefern den Nachweis für die gute Reproduzierbarkeit des Tests bei der genauen Erkennung des Zielorganismus, auch wenn eine gemischte Bakterienflora vorliegt, wie sie im Reproduktionstrakt einer Stute oder eines Hengstes vorkommen kann.

Für ausführliche Einzelheiten siehe die Datei „Ring trial for MCE by IFI: ANSES report 2013-2014“

## Anwendungen

2019 Proben von 730 Pferden wurden mit dem IDEXX IFI-Kit von CVI (Niederlande) im Rahmen eines landesweiten Screening-Programms für folgende Zwecke untersucht: Export (414 Pferde), Screening (215 Pferde), Zertifizierung für künstliche Besamung (91 Pferde) oder aus anderen Gründen, z. B. Forschung/Bestätigung (10 Pferde).

In Frankreich wird das IDEXX IFI-Kit bereits seit 2013 verwendet, vor allem für das Screening von Hengsten und Stuten zu Beginn der Zuchtsaison (obligatorisch für „pure sang“ und „trotteur français“ Pferderennen) sowie für den Transport der Tiere. Alle mit dem IFI-Test als positiv befundenen Tiere sollten durch eine Kultur bestätigt werden.

## Literaturnachweise

DA Gradinaru et al: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taylorella equigenitalis*, Vet Res (1997) 28, 65-76

## 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/contactlpd](http://idexx.com/contactlpd)

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.














© 2017 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.







## 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 Européia 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 / Límite 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

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

*Manufacturer*  
IDEXX Montpellier SAS  
326 rue de la Galéra  
34090 Montpellier  
France

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

[idexx.com](http://idexx.com)

**IDEXX**