Procedimiento de la OIE para el registro de kits de diagnóstico
Resumen de estudios de validación

Nombre del kit de diagnóstico: Prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex
Fabricante: Enfer Scientific ULC
Número de aprobación de la OIE: 20190113
Fecha de registro: mayo de 2019
Enfermedad: Tuberculosis bovina
Agente patógeno: *Mycobacterium bovis*
Tipo de ensayo: ELISA multiplex quimioluminiscente indirecto

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

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

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

1. Información sobre el kit

Consulte el manual del kit disponible en la página web del Registro de la IE o póngase en contacto con el fabricante en:

Enfer Scientific ULC
Unit T, M7 Business Park, Newhall, Naas, Kildare, Irlanda.
Sitio web: https://www.enfergroup.com/
Correo electrónico: info@enfergroup.com
Tel.: 00353 45 983800
Fax: 00353 45 983801

2. Resumen de estudios de validación

Características analíticas

Repetibilidad con suero

Para determinar las variaciones dentro de una misma serie, entre series y entre lotes, se utilizaron tres categorías de sueros: una muestra de suero negativa contra los 11 antígenos; una dilución de suero por cada antígeno que daba fuerte positividad; una dilución de suero por cada antígeno que daba positividad débil. Las muestras se efectuaron por cuadruplicado en 20 series, divididas en 2 días y 2 operarios. Se calcularon la media, la desviación típica (SD) y el coeficiente (CV). La Tabla 1 muestra la variación en las ratios de señal a corte (S/CO) dentro de una misma serie, entre series y entre lotes. Los CV oscilaron entre 1,3 % y 6,5 %, y los valores medios no superaron 2 SD en 20 series de la prueba.

Tabla 1. Variación en las ratios de S/CO dentro de una misma serie, entre series y entre lotes con muestras de suero

Prueba	Muestra	% CV
Dentro de una serie	**Positivo fuerte**	**1,3 – 3,3**
	Positivo débil	**4,0 – 6,2**
	Negativo	**Sin determinar porque las ratios de S/CO estaban cerca de cero o por debajo de cero**
Entre series	**Positivo fuerte**	**1,3 – 3,8**
	Positivo débil	**4,0 – 5,9**
	Negativo	**Sin determinar porque las ratios de S/CO estaban cerca de cero o por debajo de cero**
Entre lotes	**Positivo fuerte**	**1,3 – 3,1**
	Positivo débil	**3,6 – 6,5**
	Negativo	**Sin determinar porque las ratios de S/CO estaban cerca de cero o por debajo de cero**

Repetibilidad (leche):

Para determinar la repetibilidad dentro de una misma serie y entre series, se usaron tres categorías de muestras de leche: una muestra de suero negativa contra los 11 antígenos; una dilución de suero por cada antígeno que daba fuerte positividad; una dilución de suero por cada antígeno que daba positividad débil. Las muestras se efectuaron por cuadruplicado en 20 series, divididas en 2 días y 2 operarios. Se calcularon la media, la desviación típica (SD) y el coeficiente (CV).

La Tabla 2 muestra la variación en las ratios S/CO dentro de una misma serie y entre series. Los CV oscilaron entre 1,4 % y 11,1 %, y los valores medios no superaron 2 SD en 20 series de la prueba.

Tabla 2. Variación en las ratios S/CO dentro de una misma serie y entre series.

Prueba	Muestra	% CV
Dentro de una serie	**Positivo fuerte**	**1,4 – 3,4**
	Positivo débil	**3,8 – 9,8**
	Negativo	**Sin determinar porque las ratios de S/CO estaban cerca de cero o por debajo de cero**
Entre series	**Positivo fuerte**	**1,4 – 4,1**
	Positivo débil	**4,3 – 11,1**
	Negativo	**Sin determinar porque las ratios de S/CO estaban cerca de cero o por debajo de cero**

La prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex, por lo tanto, muestra una repetibilidad aceptable dentro de una misma serie, entre series y entre lotes para la detección anticuerpos anti-*M. bovis* en suero y leche en toda la gama del ensayo.

Especificidad analítica

Se obtuvieron muestras de sangre de 8 animales infectados experimentalmente con *M. kansasii* antes de la infección y 18 semanas después de la infección. Todos los animales dieron negativo a todos los antígenos, excepto un animal que dio resultado positivo a un antígeno.

También se obtuvieron muestras de sangre de animales infectados naturalmente que dieron positivo a un cultivo de *M*. *avium subsp. paratuberculosis (*MAP) (n = 258), positivo a anticuerpos de MAP determinado por un ELISA comercial (251), o ambos (n = 329). Los resultados de hacer en estos sueros la prueba del anticuerpo de TB bovina Enferplex dio estimaciones de especificidad relativa del 98,1 % y el 99,2 % (cultivos positivos a MAP) y del 98,0 % y el 100 % (positivos a anticuerpos de MAP) usando los ajustes de alta sensibilidad y alta especificada de la prueba, respectivamente. Estas estimaciones de especificidad relativa están cercanas a la especificidad general de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en animales sin TB bovina (98,4%) con el ajuste de alta sensibilidad de la prueba e indican una falta de reactividad cruzada entre anticuerpos de MAP y los antígenos de *M. bovis* empleados en la prueba de anticuerpos de TB bovina. Los datos indican que el kit es muy específico con respecto a las reacciones cruzadas con organismos ambientales no tuberculosos, como *M. kansasii* y MAP.

Sensibilidad analítica con suero

Se infectó experimentalmente a seis animales con *M. bovis* y se obtuvieron muestras de sangre antes de la infección y después de la infección a las 3, 7, 11 y 12 semanas. Los resultados muestran que el kit detecta anticuerpos anti-*M. bovis* en 5/6 animales en un plazo de 7 semanas de la infección experimental con *M. bovis*. En 10 animales infectados experimentalmente con *M. tuberculosis* se obtuvieron muestras de sangre antes de la infección y después de la infección a las 4, 6, 7, 8 y 9 semanas. Se detectaron anticuerpos en un plazo de 4 semanas de la infección en 2/10 animales. El kit, por tanto, detecta la infección en fases tempranas del proceso de infección. Se observaron niveles más bajos de anticuerpos tras la infección experimental con *M. tuberculosis* en comparación con *M. bovis*.

Esto puede reflejar el hecho de que *M. tuberculosis* es menos virulento en el bovino que *M. bovis.*
También se determinó el análisis de la sensibilidad analítica de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex usando una titulación del punto de valoración de una muestra de suero positiva fuerte. Los resultados muestran que los títulos de punto de valoración de antígenos individuales oscilaron entre 1:3200 – 1:512000 en los 11 antígenos de la prueba.

Sensibilidad analítica con leche
También se determinó el análisis de la sensibilidad analítica de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex usando una titulación del punto de valoración de una muestra de leche positiva fuerte. Los resultados muestran que los títulos de punto de valoración de antígenos individuales oscilaron entre 1:160 – 1:2560 en los 11 antígenos de la prueba.

Características de diagnóstico

Determinación del umbral
Los umbrales de los antígenos individuales se determinaron empíricamente, dirigidos a una especificidad general del 98% usando el ajuste de alta sensibilidad de la prueba. El umbral de la positividad general del ensayo se estableció basado en una regla de 2 antígenos por la cual las señales de unidades relativas de luz de dos o más antígenos tienen que ser superiores a los umbrales de los antígenos individuales para que la muestra sea registrada como positiva (Whelan et al, 2008). Los umbrales de los antígenos individuales se establecieron entre 95,1 y 99,8 % de especificidad basándose en un suero de referencia negativo verdadero para dar un ajuste de alta sensibilidad usando la regla de los 2 antígenos. Los umbrales de los antígenos individuales se establecieron entre 97,3 y 99,9 % de especificidad basándose en un suero de referencia negativo verdadero para dar un ajuste de alta especificidad usando la regla de los antígenos. La imagen macro de la prueba de TB bovina Enferplex suministrada calcula automáticamente los resultados de alta especificidad y alta sensibilidad.

Estimaciones de sensibilidad de diagnóstico (SnD) y especificidad de diagnóstico (EspD) con límites de confianza del 95 % (CI)
Los niveles de rendimiento indicados a continuación se basaron en varios lotes de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex y reflejan la diversidad biológica con respecto a los componentes del kit (antígenos recombinantes, tampones, conjugados, controles positivos y negativos.

***Especificidad de diagnóstico* (EspD) - suero**
La especificidad de diagnóstico relativa se calculó con animales de Reino Unido (GB), Irlanda (IE), Noruega (NO), Suiza (CH), Liechtenstein (LI), Francia (FR) y los Estados Unidos de América (US) considerados libres de TB bovina (Tabla 3).

Tabla 3. Especificidad de diagnóstico de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad en muestras de animales sin TB bovina de la Unión Europea y los EE. UU.

Categoría de animal en evaluación	Variable estadística	Especie diana – bovino Alta sensibilidad	Especie diana – bovino Alta especificidad
Animales sin TB bovina GB, IE, CH/LI, NL, ES, NO y US No potenciado	N EspD CI	**4258** **98,4 %** **98,0-97,8**	**4258** **99,7 %** **99,5-99,8**
Animales sin TB bovina FR Potenciado	N EspD CI	**161** **100 %** **-**	**161** **100 %** **-**

Los resultados muestran que la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex tiene una EspD del 98,4 % y el 99,7 % en los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad respectivamente en animales sin TB bovina no potenciados mediante inyección previa de DPP («no potenciados»). En los animales sin TB bovina potenciados por inyección previa de DPP («potenciados») la EspD fue del 100 % en ambos ajustes de sensibilidad.

Sensibilidad de diagnóstico **(SnD)**

Muestras de suero

Se estimó la sensibilidad de diagnóstico usando muestras de suero de animales con cultivo positivo a *M. bovis*, animales positivos en SICCT o CFT y animales positivos en la prueba IFNɣ de GB, IE, Italia (IT) y US.

Tabla 4. Sensibilidad de diagnóstico de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad en 478 muestras de animales que dieron positivo en cultivos de *M. bovis*

Categoría de animal en evaluación	Variable estadística	Especie diana – bovino Alta sensibilidad	Especie diana – bovino Alta especificidad
Positivo en cultivo de *M. bovis* Muestras potenciadas GB, IE	N SnD CI	**208** **94,2 %** **91,1-97,4**	**208** **94,2 %** **91,1-97,4**
Positivo en cultivo de *M. bovis* Muestras no potenciadas GB, US	N SnD CI	**182** **75,8 %** **69,6-82,0**	**182** **71,4 %** **64,9-78,0**
Positivo en cultivo de *M. bovis* Estado de potenciación desconocido IT	N SnD CI	**88** **80,7 %** **72,4-89,0**	**88** **75,0 %** **66,0-84,1**
Positivo en cultivo de *M. bovis* Todas las muestras GB, IE, US, IT	N SnD CI	**478** **84,7 %** **81,2-87,7**	**478** **82,0 %** **78,3-85,0**

Los resultados muestran que la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad tiene alta sensibilidad en los animales con cultivo positivo de *M. bovis*. La sensibilidad general de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en animales que dieron positivo en *M. bovis* fue del 84,7 % con el ajuste de alta sensibilidad. Usando el ajuste de alta especificidad de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex, la sensibilidad de diagnóstico fue del 82,0 %. Las muestras potenciadas previamente con DPP tuvieron mayor sensibilidad (94,2 %) en los ajustes de

alta sensibilidad y alta especificidad. En las muestras no potenciadas, las cifras fueron significativamente inferiores, con 75,8 % y 71,4 % respectivamente.
La prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex fue evaluada usando las pruebas SICCT o CFT como normas de referencia y los resultados se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Sensibilidad de diagnóstico relativa de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad en animales que dieron positivo en SICCT o CFT.

Categoría de animal en evaluación	Variable estadística	Especie diana – bovino Alta sensibilidad	Especie diana – bovino Alta especificidad
Positivo en SICCT Potenciadas GB, IE	N SnR CI	**2076** **92,6 %** **91,5-93,8**	**2076** **89,6 %** **88,2-90,9**
Positivo en CFT No potenciadas US	N SnR CI	**90** **82,2 %** **74,3-90,1**	**90** **75,6 %** **66,7-84,4**
Positivo en SICCT y CFT Todas las muestras GB, IE, US	N SnR CI	**2166** **92,3 %** **91,2-93,4**	**2166** **89,0 %** **87,6-90,3**

La sensibilidad general relativa de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en comparación con SICCT o CFT fue del 92,3 % con el ajuste de alta sensibilidad. Usando el ajuste de alta especificidad de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex, la sensibilidad relativa fue del 89,0 %. Las muestras potenciadas previamente con DPPb tuvieron mayor sensibilidad relativa (92,6 % y 89,6 %) en los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad respectivamente. En las muestras no potenciadas, las cifras fueron significativamente inferiores, con 82,2 % y 75,6 % respectivamente.

Se evaluó la capacidad de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex para detectar animales que han dado dos resultados consecutivos de reaccionante no concluyente (2 x RnC) en muestreo de intervalo corto en GB (considerados reaccionantes en GB). Los resultados de analizar la relación entre dos reaccionantes de RnC SICCT y las respuestas de los anticuerpos se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6. Sensibilidad de diagnóstico relativa de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex con muestras de animales de GB con 2 x estados de RnC como normas de referencia

Categoría de animal en evaluación	Variable estadística	Especie diana – bovino Alta sensibilidad	Especie diana – bovino Alta especificidad
2 x RnC Potenciado GB	N SnR CI LV o positivo a *M. bovis* (%)	**187** **87,7%** **83,0-92,4** **13 (7,9%)**	**187** **80,2%** **74,5-85,9** **13 (8,7%)**
1 x RnC Potenciado GB	N SnR CI LV o positivo a *M. bovis*	**111** **73,9%** **65,7-82,0** **10 (12,2%)**	**111** **71,2%** **62,7-79,6** **10 (12,7%)**

La sensibilidad relativa fue del 87,7 % y del 80,2 % con los valores de corte de alta sensibilidad y alta especificidad, respectivamente. Usando la presencia de LV o cultivo de *M. bovis* como normas de referencia positivas se vio que el 7,9 % y el 8,7 % de estos animales que dieron positivo en la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex dieron positivo en los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad, respectivamente.
Para los animales con estado 1 x RnC (no considerados reaccionantes en GB) la sensibilidad relativa fue del 73,9 % y el 71,2 % en los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad, relativamente. Los resultados mostraron que el 12,2 % y el 12,7 % de los animales que dieron positivo en la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex tenían LV o dieron positivo en el cultivo de *M. bovis* usando los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad, respectivamente. Por lo tanto, la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex detecta animales infectados que se registran como no concluyentes en la SICCT.
Se evaluó la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex usando la prueba IFN□ como norma de referencia y se recogen los resultados en la Tabla 7.

Tabla 7. Sensibilidad de diagnóstico relativa de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad en animales que dieron positivo en la prueba IFNγ en GB, IE, IT y US.

Categoría de animal en evaluación	Variable estadística	Especie diana – bovino Alta sensibilidad	Especie diana – bovino Alta especificidad
Positivo en IFNγ Potenciado GB, IE	N SnR CI	**1220** **86,7%** **84,8-88,6**	**1220** **82,7%** **80,6-84,8**
Positivo en IFNγ No potenciado GB, US	N SnR CI	**1317** **45,7%** **43,0-48,4**	**1317** **39,6%** **39,6-42,2**
Positivo en IFNγ Estado de potenciación desconocido IT	N SnR CI	**110** **69,1%** **60,4-77,3**	**110** **66,4%** **57,5-75,2**
Positivo en IFNγ Todas las muestras GB, IE, IT, US	N SnR CI	**2537** **65,4%** **63,6-67,3**	**2537** **60,3%** **58,4-62,2**
Negativo en IFNγ	N EspR CI	**No se realizó comparación directa en negativos en IFNγ de rebaños negativos**	

Los resultados muestran que la sensibilidad general relativa de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex usando muestras de animales que dieron positivo en la IFNɣ fue del 65,4 % en el ajuste de alta sensibilidad y del 60,3 % en el ajuste de alta especificidad. Las muestras potenciadas previamente con DPPb tuvieron una sensibilidad relativa significativamente mayor (86,7 % y 82,7 %) en los ajustes de alta sensibilidad y alta especificidad respectivamente. En las muestras no potenciadas, las cifras fueron significativamente inferiores, con 45,7 % y 39,6 % respectivamente.

Animales que dieron negativo en SICCT o IFNɣ con lesiones típicas de TB bovina
Los resultados de las pruebas con muestras que dieron negativo en la SICCT y positivo en lesiones de TB bovina en la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. Sensibilidad relativa de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en animales que dieron positivo a lesiones de TBb y negativo en las pruebas SICCT o IFNɣ.

Categoría de animal en evaluación	Variable estadística	Especie diana – bovino Alta sensibilidad	Especie diana – bovino Alta especificidad
Negativo en SICCT, positivo a lesión de TBb Potenciado GB, IE	N SnR CI	**137** **88,3 %** **82,9-93,7**	**137** **82,5 %** **76,1-88,8**
Negativo en IFNɣ, positivo a lesión de TB bovina Potenciado IE	N SnR CI	**57** **82,5 %** **72,6-92,3**	**57** **75,4 %** **64,3-86,6**

Los resultados muestran que la sensibilidad relativa de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en animales con lesiones que dieron negativo en la SICCT fue del 88,3 % en el ajuste de alta sensibilidad y del 82,5 % en el ajuste de alta especificidad. De manera similar, la sensibilidad relativa de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en animales con lesiones que dieron negativo en la IFNɣ fue del 82,5 % en el ajuste de alta sensibilidad y del 75,4 % en el ajuste de alta especificidad. Por lo tanto, los resultados muestran que la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex detecta animales infectados que se registran como negativos en la SICCT.

Relación entre el número de antígenos reconocidos por anticuerpos y la probabilidad de lesiones

Para investigar la relación entre los números de antígenos reconocidos como positivos en la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex, se probaron muestras de suero de 2056 animales que dieron positivo en la SICCT y los resultados se correspondían con el estado de las lesiones de TB bovina *post mortem*.

Si se agregan las poblaciones de animales por el número de antígenos reconocidos se puede ver en la Tabla 9 que un poco menos del 90 % de los animales que tuvieron 5 o más antígenos reconocidos por la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex tenían lesiones visibles.

Tabla 9. Relación entre el número de antígenos reconocidos y lesiones visibles en 2056 bovinos que dieron positivo en SICCT procedentes de GB e IE.

Número de antígenos reconocidos	Número total (n = 2056)	Porcentaje con LV	Porcentaje del total de LV
0 o 1	150	23,3	3,3
2 o más	1906	54,4	96,7
3 o más	1823	55,8	94,9
4 o más	1759	56,6	92,9
5 o más	1670	57,2	89,1
6 o más	1436	59,0	79,1
7 o más	1071	62,7	62,7
8 o más	804	65,5	49,2
9 o más	519	69,5	33,7
10 o más	364	74,2	25,2
11	121	78,5	8,9

Muestras de leche
Se calcularon la sensibilidad y la especificidad de diagnóstico relativas de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex con muestras de leche. Se sometieron a la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex muestras pareadas de suero y leche de 107 animales positivos en SICCT y 1149 animales de referencia verdaderos negativos en GB. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Sensibilidad relativa de la prueba de anticuerpos de TB bovina Enferplex en muestras de leche.

Categoría de animal en evaluación	Variable estadística	Especie diana – bovino Alta sensibilidad	Especie diana – bovino Alta especificidad
Positivo en SICCT	N SnR CI	**107** **91,6 %** **84,8-95,5**	**107** **82,2 %** **73,9-88,3**
Negativo en SICCT o estado oficialmente indemne de tuberculosis y antecedentes de TB bovina	N EspD CI	**1149** **99,8 %** **99,5-100,0**	**1149** **99,8 %** **99,5-100,0**

Los resultados muestran que la sensibilidad relativa fue del 91,6 % con el ajuste de alta sensibilidad y 82,2 % con el ajuste de alta especificidad de la prueba en leche. La especificidad fue del 99,8 % con el ajuste de alta sensibilidad y 99,8 % con el ajuste de alta especificidad.
Los resultados de suero y leche pareados se analizaron con el coeficiente de correlación de Spearman. Los coeficientes de correlación obtenidos para cada antígeno oscilaron entre 0,8 y 0,95 en los 11 antígenos.

Reproducibilidad

Reproducibilidad analítica
Un panel de evaluación de muestras de suero compuesto por muestras de suero negativas, positivas débiles y positivas fuertes fue cegado y enviado a los 3 laboratorios para hacer pruebas de reproducibilidad analítica. Se testaron 7 muestras negativas, 7 muestras positivas débiles y 7 muestras positivas fuertes con 2 placas de 2 lotes de kits diferentes y 1 técnico en cada laboratorio. Los resultados se enviaron a Enfer Scientific, donde se rompió el ciego y se analizaron.
Para los análisis, se efectuaron una serie de modelos lineales de efecto mixto teniendo en cuenta el lote del kit, el laboratorio, la placa y la muestra. Los resultados incluyeron las medias generales, la desviación típica, el CV, el LCI, el LCS y 95 % de CI, una estimación de cuánta variación se debía a esas variables y una evaluación estadística de las diferencias observadas.
Los resultados muestran que los CV de las muestras negativas variaron ampliamente, reflejando el hecho de que una elevada proporción de las ratios S/CO estaban cercanas a cero o por debajo de cero. Los resultados muestran que la mayoría de las respuestas de ratio S/CO observadas contra los 11 antígenos con muestras positivas débiles (63/77) tenían CV de menos del 10 %. Hubo 14 excepciones en las que los CV fueron >10 %. De estas, 13/14 estaban asociadas con respuestas que se encontraban por debajo del umbral para los antígenos individuales y se considerarían respuestas negativas para esos antígenos. Los resultados muestran que la mayoría de las respuestas de ratio S/CO con muestras positivas fuertes (68/77) tuvieron CV de menos del 10 %. Hubo 9 excepciones en las que los CV fueron >10 %. De estas, 3/9 estaban asociadas con respuestas que se encontraban por debajo del umbral para los antígenos individuales y se considerarían respuestas negativas para esos antígenos. Solo 1/6 de las respuestas restantes tuvo un CV >20 %.

Se aplicaron modelos lineales mixtos con kit, laboratorio, placa y muestra (como efectos aleatorios) para determinar cuánta de la variación en los valores de ratio S/CO se debía a esas variables. Para todos los antígenos, < 1 % de la variación se debió al kit, el laboratorio o la placa.

Reproducibilidad de diagnóstico

Un panel de evaluación de muestras de suero compuesto por muestras de suero negativas, positivas débiles y positivas fuertes fue cegado y analizado en 3 laboratorios para hacer pruebas de reproducibilidad analítica. APHA Weybridge, GB; el laboratorio de referencia para la mastitis de Molde, NO; y el laboratorio de pruebas rutinarias de Enfer Scientific, IE. Se analizaron 7 muestras negativas, 7 muestras positivas débiles y 7 muestras positivas fuertes con 2 placas de 2 lotes de kits diferentes y 1 técnico en cada laboratorio. Los resultados del laboratorio APHA y el laboratorio de Molde se enviaron a Enfer Scientific, donde se rompió el ciego y se analizaron. Los resultados muestran una concordancia completa entre los 3 laboratorios para análisis binario.

Aplicación

La prueba aún no ha sido incorporada a los regímenes de diagnóstico rutinarios.

Referencias

Whelan et al (2008). Multiplex Immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Clin. Vac. Immnunol. 15(12): 1834 – 1838.