

## TB Gamma (IGRA ELISA)

### ENSAYO DE LIBERACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA DE *Mycobacterium bovis*, ELISA

El ENSAYO DE LIBERACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA DE *Mycobacterium bovis*, ELISA se basa en que los glóbulos blancos vivos de un animal expuesto a *Mycobacterium bovis* liberarán interferón gamma (IFNy) en la presencia de antígenos de *M. bovis* en condiciones in vitro. Compara la concentración de IFNy en muestras expuestas (estimuladas) a antígenos específicos de *M. bovis* (BPPD), y aquellas que están expuestas a reactivos placebo (Nil) y/o no antígenos específicos de *Mycobacterium avium* (APPD). Proporciona información acerca de si el animal estuvo previamente en contacto con *M. bovis*. La prueba ha sido validada para su uso en muestras de sangre bovina y puede utilizarse con fines de detección o confirmación.

Las muestras de sangre bovina, en las que se utilizó li-heparina como anticoagulante, se estimulan para la liberación de interferón gamma utilizando antígenos PPD de tuberculina bovina (PPDB), PPD de tuberculina aviar (PPDA) y placebo (Nil). Después de la estimulación, se realiza un ensayo ELISA sándwich para determinar una concentración relativa de interferón gamma en las muestras. La prueba diagnóstica utiliza placas de microtitulación recubiertas con IFNy que capturan anticuerpos monoclonales. IFNy presente en la muestra se unirá a los anticuerpos recubiertos en la placa. Después de retirar la muestra, el conjugado se une al IFNy que se inmoviliza en la placa. Después de la incubación, cualquier conjugado no unido se elimina en un paso de lavado, y cualquier conjugado restante se revela utilizando un sustrato TMB, que produce color en presencia de un HRP. Un lector de microplacas se utiliza para medir la densidad óptica del color producido. La cantidad de color generado es proporcional a la cantidad de IFNy presente en la muestra.

# Contenido del kit

Reactivos	Kit 2 placas	Kit 5 placas
<b>5 x Control positivo seco</b>	<b>2 x 1 ml</b>	<b>5 x 1 ml</b>
Liofilizado Recombinante bovino IFNy. Debe reconstituirse con 1 ml de diluyente antes de su uso. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.		
<b>Control negativo</b>	<b>2 ml</b>	<b>4 ml</b>
Listo para usar; Suero bovino libre de IFNy bovino. Contiene 0.095% de azida de sodio como conservante. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.		
<b>Diluyente</b>	<b>60 ml</b>	<b>120 ml</b>
Listo para usar; fórmula patentada. El diluyente contiene 0.1% ProClin 300 de conservante. Código de Peligro: No clasificado según la normativa de la UE.		
<b>Conjugado 100X</b>	<b>0.5 ml</b>	<b>1 ml</b>
Una fórmula patentada que contiene anticuerpos anti IFNy bovino. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.		
<b>Sustrato</b>	<b>30 ml</b>	<b>70 ml</b>
Listo para usar; Solución TMB tamponada. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.		
<b>Buffer de lavado 10X</b>	<b>100 ml</b>	<b>2 x 100 ml</b>
Una fórmula propia. Contiene 0.1% ProClin 300 como conservante. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.		
<b>Diluyente conjugado</b>	<b>30 ml</b>	<b>70 ml</b>
Una fórmula patentada que contiene albúmina sérica animal. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE. .		
<b>Placa recubierta DE IFNy AB Bovino</b>	<b>2 placas</b>	<b>5 placas</b>
IFNy AB de microplacas recubiertas. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.		
<b>Solución de parada</b>	<b>30 ml</b>	<b>70 ml</b>
Listo para usar; solución ácida de baja concentración. Código de peligro: <b>R35</b> - Causa quemaduras graves; <b>S26</b> - En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque consejo médico; <b>S36/37/39</b> - Use ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos / cara; <b>S45</b> - En caso de accidente o si se siente mal, busque consejo médico de inmediato (muestre la etiqueta en el vial).		

---

**PPD aviar (APPD)****2 x 1 ml****5 x 1 ml**

---

Estéril, libre de conservantes, líquido que contiene derivados de proteínas purificadas preparadas a partir del filtrado de *Mycobacterium avium* muerto por calor.

Código de peligro: No clasificado según las regulaciones de la UE.

---

**PPD bovino (BPPD)****2 x 1 ml****5 x 1 ml**

---

Estéril, libre de conservantes, líquido que contiene derivados de proteínas purificadas preparadas a partir del filtrado de *Mycobacterium bovis* muerto por calor.

Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.

---

## Requerido pero no proporcionado

---

- Micropipetas de precisión de un solo y multidispensación, y **puntas estériles** para volúmenes entre 10 y 1000 µl (*por ejemplo*, pipetas individuales de 10-100 y 100-1000 µl y pipeta multicanal de 5-50 y 20-200 µl)

**Nota: El uso de puntas estériles es obligatorio solo en la fase de estimulación sanguínea debido a la posible estimulación inespecífica de glóbulos blancos en caso de contaminación bacteriana.**

- Microplacas estériles de 24 pozos para la estimulación de la muestra (*por ejemplo*, Greiner cat no. 662102)
- Placa(s) de 96 pozos de transferencia no recubiertas de antígenos
- Botellas de plástico o vidrio con taparrosca, vasos de precipitados de laboratorio o matraces Erlenmeyer para hacer Buffer de lavado listo para usar
- NaCl estéril, libre de endotoxinas al 0,9%, que generalmente se encuentra en farmacias locales como solución fisiológica estéril
- Depósitos de reactivos para transferir reactivos a placas
- Lector de microplacas ELISA equipado con filtro de 450 nm
- Agua purificada desionizada, destilada o RO para preparar buffer de lavado.
- Sistema de lavado manual o automático de microplacas
- Incubadora capaz de mantener una temperatura de +37°C
- Tapas de cubierta de microplacas o lámina adhesiva para cubrir placas
- Agitador de microplacas y mezclador vórtex
- Para la toma de muestras de sangre, use tubos de recolección de sangre de Li-Heparina de 10 ml (parte superior verde)
- Para obtener suministros, comuníquese con nuestro servicio de atención al cliente en [support@ellielab.com](mailto:support@ellielab.com).

## Almacenamiento y estabilidad

---

El kit debe almacenarse a 2-8 °C.

**No equilibre el conjugado 100X a temperatura ambiente para su uso. Úselo directamente del refrigerador para preparar los componentes. Regréselo al refrigerador después de su uso.** Todos los demás reactivos del kit deben equilibrarse a temperatura ambiente (20-25 ° C) durante un mínimo de 90 minutos antes de su uso.

El kit se transporta en una caja refrigerada a una temperatura entre 0 y 15°C.

No utilice componentes después de la fecha de expiración. No mezcle reactivos de diferentes seriales de kits. No exponga la solución de TMB a la luz fuerte ni a ningún agente oxidante. Manipule la solución de TMB con vidrio limpio o plástico.

Se debe tener cuidado para evitar la contaminación de los componentes del kit.

## Advertencias

---

- Todos los reactivos son solo para uso de diagnóstico *in vitro*.
- No pipetear por vía oral.
- Evite el contacto con la piel abierta.
- El azida de sodio es una sustancia tóxica y se utiliza en algunos reactivos. En caso de contacto con los ojos y la piel, enjuague inmediatamente con abundante agua. El azida de sodio puede reaccionar con el plomo y las tuberías de cobre para formar azidas metálicas explosivas. Al desechar los reactivos, enjuague con un gran volumen de agua para ayudar a prevenir la acumulación de azida.
- Solución de parada contiene una solución ácida diluida. Usar con cuidado para evitar el contacto con la piel y los ojos. Evite la exposición a bases, metales u otros compuestos que puedan reaccionar con los ácidos. Los derrames deben limpiarse de inmediato.

Todos los materiales de este kit deben tratarse de acuerdo con la hoja de datos de seguridad del producto.

## Requisitos de la muestra

---

La prueba Gamma de TB gamma de Ellie se puede realizar con muestras de sangre bovina.

## Procedimiento de estimulación

La estimulación debe hacerse inmediatamente después de tomar muestras o máximo 30 horas después. La sangre no debe congelarse, refrigerarse o sobrecalentarse en ningún momento durante la incubación o el transporte.

### Extracción de sangre:

Recolectar sangre asépticamente usando tubos de recolección de sangre de Li-Heparina y tomar un mínimo de 6 ml de muestra de sangre venosa.

### Transporte de muestras:

En caso de que las muestras se envíen al laboratorio, las muestras no deben congelar ni sobrecalentarse. La temperatura de transporte debe estar entre 18 y 26 °C.

### Preparación de los reactivos de estimulación

Preparar diluciones de trabajo de reactivos de estimulación diluyendo APPD y BPPD con NaCl al 0,9% estéril libre de endotoxinas (por ejemplo, diluir 160 ul of APPD y BPPD en 840 ul de 0,9% NaCl). Mezclar bien.

### Estimulación

1. Mezcle las muestras de sangre uniforme e inmediatamente antes de usar.
  2. Para cada estimulación, transfiera 1,5 ml de sangre a los pocillos de una placa de microtitulación de 24 pozos. Llene un mínimo de dos pocillos para cada muestra para la estimulación Nil y BPPD de la prueba de acuerdo con el protocolo de detección, o tres pocillos para la estimulación Nil, BPPD y APPD para pruebas según el protocolo confirmatorio.
- Agregue 100 µl de reactivos de estimulación a cada pozo correspondiente, de acuerdo con los esquemas a continuación.

Protocolo de detección

	1 (Nil)	2 (BPPD)	3 (Nil)	4 (BPPD)	5 (Nil)	6 (BPPD)
Un	<b>Ejemplo 1</b> Nil	<b>Ejemplo 1</b> BPPD	<b>Ejemplo 5</b> Nil	<b>Ejemplo 5</b> BPPD	<b>Ejemplo 9</b> Nil	<b>Ejemplo 9</b> BPPD
B	<b>Ejemplo 2</b> Nil	<b>Ejemplo 2</b> BPPD	<b>Ejemplo 6</b> Nil	<b>Ejemplo 6</b> BPPD	<b>Ejemplo 10</b> Nil	<b>Ejemplo 10</b> BPPD
C	<b>Ejemplo 3</b> Nil	<b>Ejemplo 3</b> BPPD	<b>Ejemplo 7</b> Nil	<b>Ejemplo 7</b> BPPD	<b>Ejemplo 11</b> Nil	<b>Ejemplo 11</b> BPPD
D	<b>Ejemplo 4</b> Nil	<b>Ejemplo 4</b> BPPD	<b>Ejemplo 8</b> Nil	<b>Ejemplo 8</b> BPPD	<b>Ejemplo 12</b> Nil	<b>Ejemplo 12</b> BPPD

Protocolo confirmatorio

	1	2	3	4	5	6
Un	<b>Ejemplo 1</b> Nil	<b>Ejemplo 1</b> APPD	<b>Ejemplo 1</b> BPPD	<b>Ejemplo 5</b> Nil	<b>Ejemplo 5</b> APPD	<b>Ejemplo 5</b> BPPD
B	<b>Ejemplo 2</b> Nil	<b>Ejemplo 2</b> APPD	<b>Ejemplo 2</b> BPPD	<b>Ejemplo 6</b> Nil	<b>Ejemplo 6</b> APPD	<b>Ejemplo 6</b> BPPD
C	<b>Ejemplo 3</b> Nil	<b>Ejemplo 3</b> APPD	<b>Ejemplo 3</b> BPPD	<b>Ejemplo 7</b> Nil	<b>Ejemplo 7</b> APPD	<b>Ejemplo 7</b> BPPD
D	<b>Ejemplo 4</b> Nil	<b>Ejemplo 4</b> APPD	<b>Ejemplo 4</b> BPPD	<b>Ejemplo 8</b> Nil	<b>Ejemplo 8</b> APPD	<b>Ejemplo 8</b> BPPD

4. Cierre las placas con tapas de placas, mezcle bien y proceda con la incubación.
5. Incubar a  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-48 horas. Una incubación más larga aumenta la sensibilidad del ensayo.

# Pasos preliminares

---

## Preparación de reactivos

Todos los reactivos del kit deben equilibrarse a temperatura ambiente (20-25 ° C) antes de su uso, excepto **el Conjugado 100X**.

Tome la placa recubierta de IFN- $\gamma$  de la bolsa de aluminio. Si usa placas parciales, solo retire el número de pozos necesarios para analizar todas las muestras. Vuelva a colocar los pocillos restantes en la bolsa y devuélvalos a 2-8°C.

## Preparación del Buffer de lavado

Prepare Buffer de lavado listo para usar mezclando una parte de Buffer de lavado 10X con 9 partes de agua destilada o desionizada. Es muy importante equilibrar el Buffer de lavado a temperatura ambiente antes de su uso. Mezclar bien. La cantidad de Buffer de lavado necesaria para lavar un plato es de 300 ml. Guarde el Buffer de lavado a temperatura ambiente hasta un mes.

## Preparación conjugado

Diluir el conjugado 100X concentrado 1:100 con el diluyente de conjugado combinando una parte del conjugado 100X con 99 partes diluyente de conjugado (*por ejemplo*, la cantidad necesaria para una placa se prepara mezclando 110  $\mu$ l de conjugado concentrado y 10,89 ml de diluyente de conjugado). Devuelva el conjugado 100X a 2-8 °C después de su uso. Proteja la dilución preparada de la luz. ¡La dilución de trabajo preparada de conjugado debe usarse el mismo día en que se prepara!

## Preparación de control positivo

1. Añadir 1 ml de diluyente en el vial de control positivo;
2. Incubar durante 15 minutos;
3. Mezclar bien;
4. Conservar a 2-8°C durante un máximo de 2 meses.

## *Preparación de Muestras y Controles*

1. Después de la estimulación, centrifugue muestras de sangre a  $2000 \pm 200$  g durante 5 minutos en una centrifuga de placa o transfiera la sangre a tubos de microcentrifuga, marque los tubos y centrifúguelos a  $2000 \pm 200$  g durante 5 minutos. Si las centrifugas no están disponibles, una pequeña cantidad de plasma se separará en la parte superior de cada pozo durante la etapa de incubación.
2. Use plasma para pruebas adicionales. Transfiera 130  $\mu$ l de muestras y controles a los pozos apropiados de la placa de transferencia de 96 pozos. Controles de pipeta por duplicado.

## Procedimiento de prueba

---

1. Transfiera 100  $\mu$ l de muestras de plasma y controles de la placa de transferencia de 96 pocillos a los pozos de prueba de placa recubierta gamma de IFN bovino correspondientes.
2. Cubra la placa con papel de aluminio protector e incube durante 60 minutos a 36-38°C.
3. Lavar el plato:
  - Retire la lámina de la placa;
  - Vierta el contenido de la placa;
  - Lavar cuatro veces con 300  $\pm$  20  $\mu$ l de Buffer de lavado.
  - Golpee la placa firmemente sobre papel absorbente después del último paso de lavado.
4. Dispensar 100  $\mu$ l de conjugado en cada pozo.
5. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
6. Lavar el plato:
  - Vierta el contenido de la placa;
  - Lavar cuatro veces con 300  $\pm$  20  $\mu$ l de tampón de lavado ;
  - Golpee la placa firmemente sobre papel absorbente después del último paso de lavado.
7. Dispensar 100  $\mu$ l de sustrato en cada pozo.
8. Incubar durante 15  $\pm$  3 minutos a temperatura ambiente.
9. Dispensar 100  $\mu$ l de Solución de parada en cada pozo.
10. Lea los resultados a 450 nm en un lector de microplacas.

## Validación de pruebas

---

- La media DO de los controles negativos deben leer menos de 0.200 DO.
- La DO media de los controles positivos debe ser superior a 0.800 DO.
- El valor de DO nil de la muestra de ensayo debe ser superior a 0.400.
- Si se realiza una estimulación mitógeno (Pokeweed), el valor DO de la muestra de prueba estimulada con Pokeweed debe leer más de 0.500.

Si no se cumplen los criterios de validación, los resultados de las pruebas no son válidos y las muestras deben volver a analizarse.

## Resultados e interpretación

---

### Protocolo de detección

Para el tamizaje de muestras, los resultados se interpretan de acuerdo con, la siguiente tabla:

<b>PRESUNTO POSITIVO</b>
Muestra BPPD - Muestra Nil $\geq 0.100$

<b>NEGATIVO</b>
Muestra BPPD - Muestra Nil $< 0.100$

### Recomendación

En caso de granja con tuberculosis positiva, las muestras presuntamente positivas pueden considerarse positivas y no es necesario volver a realizar pruebas. En caso de estado desconocido de la granja, se recomienda volver a probar animales presuntamente positivos utilizando Protocolo confirmatorio.

### Protocolo confirmatorio

Para la confirmación de TB, se recomienda ejecutar muestras estimuladas por Nil, APPD y BPPD. La interpretación de los resultados se realiza de acuerdo con la siguiente tabla:

<b>POSITIVO</b>
Ejemplo BPPD - Ejemplo Nil $\geq 0.100$ y Ejemplo BPPD - Ejemplo APPD $\geq 0.100$

<b>NEGATIVO</b>
Ejemplo BPPD - Ejemplo Nil $< 0.100$ o Ejemplo BPPD - Ejemplo APPD $< 0.100$

## Recomendación

Confirmar o excluir la tuberculosis en una granja o diagnosticar a un animal individual requiere una combinación de hallazgos epidemiológicos, clínicos y otros hallazgos diagnósticos que deben tenerse en cuenta al interpretar el resultado de la prueba. No se recomienda basarse únicamente en el resultado de una prueba o método, en particular porque las infecciones por micobacterias de los animales de granja no se describen completamente y otros factores desconocidos podrían crear resultados falsos positivos o negativos.

## Limitación de la prueba

La sensibilidad de la prueba depende de la fase de la enfermedad y de la viabilidad de los glóbulos blancos durante la fase de estimulación.

Los resultados falsos pueden ocurrir debido a:

1. Técnica incorrecta;
2. Uso de cualquier anticoagulante que no sea heparina;
3. Niveles excesivos de IFN $\gamma$  circulante;
4. Uso de reactivos contaminados;
5. Inmunosupresión causada por el tratamiento reciente con dexametasona (dentro de los 7 días), parto (dentro de las 4 semanas) y coinfección con *Fasciola Hepatica* (casualidad hepática);
6. Coinfección con otras *Mycobacterium spp.*
7. Otras desviaciones del procedimiento de prueba recomendado.

***ellie***

N114 W19320 Clinton Dr., Unit 5  
Germantown, WI 53022, United States of America  
Phone: +1 (800) 556-6953  
[support@ellielab.com](mailto:support@ellielab.com)