

ENFER TSE Versión 3

06L72 (450 análisis por duplicado)

Inmunoensayo para la detección in vitro de la proteína priónica PrP^{Sc} relacionada con las EET

Método A de homogeneización manual y método B de procesamiento automatizado de las muestras








Dentro de la Unión Europea, esta prueba está aprobada como prueba rápida para los programas de detección de EEB en ganado bovino, establecidos de acuerdo con el Reglamento (CE) Nº 999/2001

Uso exclusivo para diagnóstico veterinario *in vitro*

Enfer Scientific cumple con la norma de calidad ISO9001

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

Clave de Símbolos utilizados:

	Lote:		Conservar entre -25°C y -15°C
	Utilizar antes de:		Conservar entre 2°C y 8°C
	Conservar entre 2°C y 30°C		Conservar entre 10°C y 30°C
	Consulte las instrucciones de utilización		

Índice

	Apartado
Información general	1.0
Finalidad de uso	2.0
Principio del procedimiento	3.0
Reactivos	4.0
Advertencias y precauciones	5.0
Información sanitaria y de seguridad	6.0
Recogida, transporte y almacenamiento de las muestras	7.0
Precauciones analíticas	8.0
Materiales necesarios pero no suministrados	9.0
Homogeneización	9.1
Transferencia automática de muestras (opcional)	9.2
Instrumentación	9.3
General	9.4
Parámetros para la configuración de los instrumentos	10.0
Lavador	10.1
Incubador/agitador	10.2
ETDS VIII	10.3
Preparación de los reactivos	11.0
Preparación de los controles tisulares	12.0
Control tisular negativo	12.1
Control tisular positivo	12.2
Procedimiento de preparación de la muestra	13.0
Método A - homogeneización manual	13.1
Método B - homogeneización automatizada	13.2
Procedimiento del inmunoensayo	14.0
Resultados	15.0
Validación del ensayo	15.1
Interpretación de los resultados	15.2
Límites del procedimiento	15.3
Descargo de responsabilidad y reserva de derechos	16.0
Diagrama recomendado de la placa	17.0
Apéndices	
Instrucciones para la toma de muestras de tejido usando la herramienta de corte de muestras Enfer	I
Opciones de los procedimientos manual y automatizado	II

El fabricante de pruebas rápidas debe tener en vigor un sistema de control de calidad aprobado por el Laboratorio de Referencia de cada Comunidad (LRC) que asegure que el rendimiento de la prueba no cambia. El fabricante debe proporcionar el protocolo de la prueba al LRC. La toma de muestras y las modificaciones de la prueba rápida o del protocolo de la técnica (incluida la toma de muestras) sólo pueden hacerse después de notificarlo por adelantado al LRC y siempre que el LRC considere que la modificación no reduce la sensibilidad, la especificidad o la fiabilidad de la prueba rápida. Ese hecho debe comunicarse a la Comisión y a los Laboratorios de Referencia Nacionales (LRN).

1.0 Información general

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurológicas degenerativas. Algunos de los ejemplos de EET son: la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) (bovina), la tembladera (*scrapie*) (ovina), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (EJC) (humana), el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) (humano), el kuru (humano), la encefalopatía transmisible de los visones, la enfermedad crónica caquetizante (ciervo mula norteamericano), la encefalopatía espongiforme felina y otras enfermedades encontradas en animales, como el alce, el niala, el gran kudú, el órice y el tigre. La EEB también puede transmitirse a ratones y cerdos en condiciones experimentales. Esta capacidad del agente infeccioso de atravesar la barrera de especie ha suscitado una preocupación creciente con respecto a la posibilidad de transmisión al hombre.

El examen *post mortem* de animales infectados revela un aspecto característico de vacuolización del tejido cerebral debido a la destrucción de las células neuronales y al depósito de fibrillas proteicas anormales, que dan al cerebro una textura esponjosa. El agente supuestamente responsable de las EET es una proteína con capacidad infectiva denominada 'prión'. El prión es una partícula infecciosa aparentemente compuesta sólo de proteína y sin ningún ácido nucleico. Se ha descubierto una proteína, la PrP^{Sc}, que copurifica con la infectividad y es el único componente conocido de las fibrillas proteicas características que se depositan en el tejido cerebral de los animales infectados.

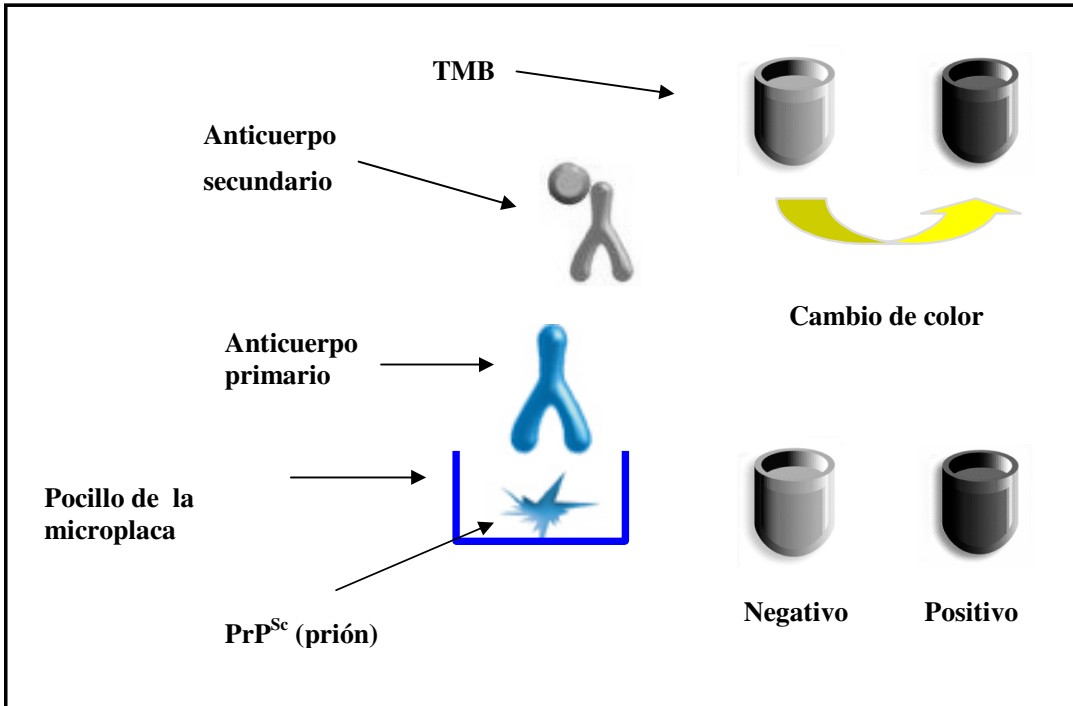
2.0 Finalidad de uso

Enfer TSE Versión 3 es un método inmunológico cualitativo para la detección del único identificador de las encefalopatías espongiformes transmisibles, la proteína priónica PrP^{Sc}, en el tejido nervioso central del ganado bovino. Este kit está previsto exclusivamente para el cribado y la investigación.

3.0 Principio del procedimiento

Se recoge una muestra de tejido nervioso central, se transporta al laboratorio de análisis, se homogeneiza en condiciones definidas y se centrifuga. El sobrenadante se incuba en los pocillos de la microplaca: durante esta incubación, la PrP^{Sc} presente en la muestra se une a los pocillos. Después de una etapa de lavado, los pocillos se tratan con tampón Enfer 3. Después de una segunda etapa de lavado, se agrega a los pocillos anticuerpo de conejo anti-PrP (anticuerpo primario) y se incuba; si un pocillo contiene PrP^{Sc}, este antisuero se le va a unir específicamente. Después de una tercera etapa de lavado, se agrega a los pocillos anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (anticuerpo secundario) y se incuba; si en algún pocillo hay anticuerpo primario, el anticuerpo secundario se le unirá. El anticuerpo secundario sin unir se elimina mediante lavado y se añade a los pocillos una solución con 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. Los pocillos con anticuerpo secundario unido desarrollan un color morado, que se convierte en un color naranja cuando se detiene la reacción con ácido sulfúrico y el color se lee espectrofotométricamente a 450 nm. La cantidad de anticuerpo secundario y, por tanto, de color, en los pocillos, está directamente relacionada con la concentración de PrP^{Sc} en la muestra.

Consulte el diagrama siguiente:



4.0 Reactivos

Enfer TSE Versión 3 (06L72) está compuesto por: Caja de reactivos (06L72-06), Caja de anticuerpos (06L72-12), Caja de las soluciones de lavado / tampón (06L72-32)

Reactivos accesorios para Enfer TSE Versión 3: Caja de tampón suplementario (06L72-50)

Componentes del equipo

Caja de reactivos 06L72-06. Contiene material suficiente para 450 pruebas.

La caja de reactivos se conserva entre 2 °C y 8 °C. Tome nota de las condiciones de conservación de los componentes individuales.

	Componente	Función	Cantidad	Condiciones de conservación
1	Placa para centrifuga	Placa empleada para la centrifugación, para retirar el tejido conectivo.	16 placas de 96 pocillos	2 °C a 30 °C en bolsas selladas
2	Placa de ensayo Enfer	Microplaca utilizada para el ensayo.	10 placas de 96 pocillos	2 °C a 30 °C en una bolsa sellada con el desecante suministrado. Los pocillos sobrantes no utilizados deben volverse a almacenar en estas condiciones.
3	Solución de lavado Enfer 1	Elimina la muestra no unida.	1 frasco con 700 g de polvo	2 °C a 30 °C
4	Tampón Enfer 3	Solución amarilla que detiene la reacción de la proteinasa K y desnaturaliza la secuencia del PrP unida.	2 frascos con 100 ml de solución a la concentración de trabajo	2 °C a 8 °C, bien cerrado
5	Pocillos indicadores de péptidos	Pocillos revestidos de péptidos empleados para asegurar que el análisis es válido.	48 pocillos, en 24 pares	2 °C a 8 °C en una bolsa sellada con el desecante suministrado. Vuelva a almacenar los pocillos no utilizados en estas condiciones.
6	Diluyente de los anticuerpos	Diluyente rojo para la dilución de los anticuerpos primario y secundario.	500 ml de solución a la concentración de trabajo (contiene Bronidox [®] al 0,05%)	2 °C a 8 °C
7	Suero normal de cabra (SNC)	Suero sin diluir. Bloquea los sitios de unión inespecíficos.	3 microviales con 0,3 ml de suero	2 °C a 8 °C
8	Anticuerpo secundario	Anticuerpo secundario no diluido (conjugado de anticuerpo de cabra anti-conejo), conjugado con peroxidasa, que se une al anticuerpo primario.	2 microviales con 0,15 ml de suero	2 °C a 8 °C
9	Concentrado de TMB	3,3',5,5',-tetrametilbenzidina (TMB) y estabilizantes en una solución rosa, convertidos por la peroxidasa para dar un cambio de color visible, al combinarse con el diluyente de TMB.	2 frascos con 35 ml de solución	2 °C a 8 °C
10	Diluyente de TMB	Solución incolora de citrato trisódico y peróxido de hidrógeno. Empleados para diluir el concentrado de TMB.	2 frascos con 35 ml de solución	2 °C a 8 °C

Caja de anticuerpos 06L72-12. Contiene material suficiente para 450 pruebas.



	Componente	Función	Cantidad	Condiciones de conservación
1	Tampón Enfer 2	Contiene proteinasa K en una solución azul que digerirá preferentemente PrP ^c , para dejar PrP ^{Sc}	2 frascos con 15 ml de solución a la concentración de trabajo cada uno	-25 °C a -15 °C . Puede congelarse y descongelarse hasta 15 veces o conservarse 7 días entre 2 °C y 8 °C
2	Anticuerpo primario	Anticuerpo primario no diluido (anti-PrP de conejo) que reconoce tanto el PrP ^c como el PrP ^{Sc}	2 microviales con 0,2 ml	-25 °C a -15 °C o 7 días entre 2 °C y 8 °C

Caja de soluciones de lavado/tampón 06L72-32. Contiene material suficiente para aproximadamente 450 pruebas

	Componente	Función	Cantidad	Condiciones de conservación
1	Tampón Enfer 1	Tampón de homogeneización que libera tanto PrP ^c como PrP ^{Sc}	4,5 l de solución a la concentración de trabajo	10 °C a 30 °C (Para reducir al mínimo la precipitación y el tiempo de disolución posterior, conserve el tampón Enfer 1 entre 17 °C y 28 °C)
2	Solución de lavado Enfer 2	Lava el anticuerpo/reactivo no unido	4 l de solución concentrada 10x (contiene Bronidox [®] al 0,05%)	10 °C a 30 °C

Caja de tampón suplementario 06L72-50. Contiene material suficiente para aproximadamente 900 pruebas, facilitada bajo pedido como componente genérico separado.

	Componente	Función	Cantidad	Condiciones de conservación
1	Tampón Enfer 1	Tampón de homogeneización que libera tanto PrP ^c como PrP ^{Sc}	2 frascos con 4,5 l de solución a la concentración de trabajo cada uno	10 °C a 30 °C (Para reducir al mínimo la precipitación y el tiempo de disolución posterior, conserve el tampón Enfer 1 entre 17 °C y 28 °C)

5.0 Advertencias y precauciones

Los reactivos son exclusivamente para uso en diagnóstico veterinario *in vitro* en muestras bovinas para el método A y el método B. Véase el Apéndice II.

Sólo para uso profesional.

Le rogamos que se remita a la hoja de seguridad del fabricante y a la etiqueta del producto para obtener información sobre los componentes potencialmente peligrosos.


Prepare las muestras, dispénelas en la placa de ensayo Enfer, retire la tira selladora de la microplaca y realice el primer paso de lavado en una campana de seguridad biológica.

Para precauciones específicas, consulte el reglamento de seguridad para EET de su país.


6.0 Información sanitaria y de seguridad

Los siguientes reactivos deben manipularse con cuidado. Le rogamos que tenga en cuenta los riesgos identificados en las etiquetas de cada envase.

El tampón Enfer 3 contiene cloruro de guanidinio y ha sido clasificado como nocivo (Xn) según las Directivas aplicables de la CEE. A continuación se indican las frases relativas a los riesgos (R) y medidas de seguridad (S).

Xn	R22	Nocivo por ingestión.
	R36/38	Irrita los ojos y la piel.
	S26	En caso de contacto con los ojos, lávense inmediatamente con agua y acúdase a un médico.
	S35	Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.
	S36/37	Use guantes y ropa protectora adecuados.
	S46	En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrela la etiqueta o el envase.

El tampón Enfer 1 contiene metanol y ha sido clasificado como tóxico (T) según las Directivas aplicables de la CEE. A continuación se indican las frases relativas a los riesgos (R) y medidas de seguridad (S).

T	R10	Inflamable.
	R20/21/22	Nocivo por inhalación, si entra en contacto con la piel o por ingestión.
	R39/23/24/25	Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación, por contacto con la piel e ingestión.
	S16	Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas. No fumar.
	S26	En caso de contacto con los ojos, lávense inmediatamente y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
	S35	Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.
	S36/37/39	Use ropa protectora, guantes y protección ocular/ facial adecuados.
S45	En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstrela la etiqueta).	

Información para clientes europeos: para aquellos productos que no hayan sido clasificados como peligrosos según la Directiva Europea 1999/45/EC, la ficha de datos de seguridad está a disposición del usuario profesional.

Se recomienda que estos reactivos y muestras para el ensayo se manipulen usando buenas prácticas de laboratorio.

Se recomienda seguir las directrices de la OMS para la descontaminación de las superficies de trabajo, y para los materiales de desecho líquidos y sólidos.

Las muestras de tejido nervioso central deben desecharse como material específico de riesgo de acuerdo con las normativas locales vigentes.

Véase el SI N° 146 de 1994 (guías de la Unión Europea) para conocer las reglamentaciones pertinentes de seguridad, salud y bienestar laboral, que incluye una extensa revisión de los procedimientos de seguridad recomendados para trabajar con material biológico potencialmente infeccioso.

7.0 Recogida, transporte y almacenamiento de las muestras

Consulte el procedimiento para la preparación de las muestras.

No se requieren condiciones de transporte especiales para el traslado de las muestras al laboratorio. No obstante, en caso de almacenamiento, las muestras pueden conservarse entre 2 °C y 8 °C hasta 24 horas o entre -25 °C y -15 °C durante períodos más largos. Con este ensayo no pueden usarse tejidos fijados con formol.

La fijación con formol para un eventual análisis de confirmación mediante métodos histopatológicos o inmunohistoquímicos debe realizarse inmediatamente después de la obtención de las muestras. Las muestras para esta confirmación deben transportarse de modo que no se destruya la muestra y no deben congelarse, en ninguna circunstancia, antes de que la fijación con formol se haya completado.

8.0 Precauciones analíticas

1. No modifique el procedimiento del ensayo ni sustituya los reactivos por los de otros fabricantes. El Tampón Enfer 1 incluido en este equipo puede intercambiarse con reactivos de cualquier otro equipo Enfer TSE Versión 3. Ningún otro reactivo puede intercambiarse entre equipos de distinto lote. Cuando utilice el Tecan Genesis RSP[®]/ Freedom EVO[®], debe usar placas de centrifuga de pocillos profundos. Estas se suministran por separado (código de pedido 01J91-10), y **pueden** intercambiarse entre equipos de distinto lote.
2. No use los reactivos pasada la fecha de caducidad indicada. Debe evitarse la contaminación microbiológica de los reactivos, porque puede reducir la vida útil del producto y generar resultados erróneos.
3. Todos los reactivos deben prepararse en frascos de vidrio o polipropileno limpios. Se debe tener cuidado para evitar la contaminación cruzada de los reactivos.
4. **NO DEBEN UTILIZARSE RECIPIENTES DE POLIESTIRENO PARA RECONSTITUIR O CONSERVAR LOS MATERIALES.**
5. Una vez que se comienza el ensayo, debe completarse sin interrupción.
6. Para cada muestra, use material de disección y de transporte separado, así como puntas desechables, para evitar las contaminaciones cruzadas.
7. Los reactivos no deben contener cristales, deben mezclarse bien y deben estar a temperatura ambiente (entre 18 °C y 30 °C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso, almacene todos los reactivos y pocillos no usados a la temperatura de almacenamiento recomendada.
8. No toque ni salpique el reborde del pocillo con el anticuerpo secundario. Se recomienda el pipeteo inverso para agregar los reactivos y para transferir la muestra de la bolsa de homogeneización o del tubo de ensayo ETDS a la placa para centrifuga, pero **no** para transferirla a los pocillos de las placas de ensayo Enfer. Pipetee cuidadosamente para evitar las burbujas de aire y las salpicaduras. Destine una pipeta para su uso exclusivo con la solución de TMB.
9. Evite el uso de congeladores con autodescongelación para el almacenamiento de reactivos y muestras.
10. No exponga los reactivos a la luz fuerte ni a vapores de hipoclorito durante el almacenamiento o durante los pasos de incubación.
11. Encienda los incubadores al menos 30 minutos antes del uso para asegurar que alcanzan una temperatura de 34 °C \pm 2 °C.
12. Vuelva a colocar el soporte térmico de la microplaca en el incubador inmediatamente después de retirar la placa; de esta forma se mantiene una temperatura constante.
13. Asegúrese de que las muestras no entran en contacto con soluciones de limpieza o desinfección antes del análisis.
14. Los lectores de microplacas deben verificarse al menos una vez al mes usando un filtro de densidad neutra o una placa de prueba similar, según la recomendación del fabricante. Esto no es aplicable a los lectores colorimétricos suministrados e instalados por Enfer.
15. No conserve la solución para parar la reacción en una bandeja poco profunda ni la vuelva a verter en el frasco de reserva después de su uso.

9.0 Materiales necesarios pero no suministrados

9.1 Homogeneización

Manual (Método A)	O	Procesamiento automatizado de las muestras (Método B)
Homogeneizador Interscience o Seward Stomacher® 80* Bolsas de homogeneización (con capacidad para 80 ml con filtro)		ETDS VIII (EQP001-1)* Conjunto de homogeneización ETDS (Contiene tubo de muestras de ETDS, eje molidor y tapa desechable) (01J90-20)* Gradilla de homogeneización (EQP002-1)*

9.2 Transferencia automatizada de muestras (opcional)

- Tecan Genesis RSP®/ Freedom EVO® (01J91-01)*
- Placa de centrifuga de pocillos profundos (01J91-10)*
- Punta de pipeta de 200 µl (01J91-20)†
- Punta de pipeta de 1000 µl (01J91-30)†
- Cubetas de reactivos (01J90-40)*
- Puntas alargadas de 1 000 µl (01J90-10)†

9.3 Instrumentación

Para el procesamiento manual de las placas	O	Para el procesamiento automatizado de las placas
2 lavadores de microplacas Skatron Skanwasher® 300* Incubador/agitador Thermo Labsystems iEMS* Lector de microplacas capaz de medir a 450 nm con un filtro de referencia de 690 nm		en4lisa (08L22-01)* Frasco de reactivo en4lisa (08L22-50)* Punta en4lisa de 300 µl (08L22-25)* Punta en4lisa de 1 100 µl (08L22-30)*

Todos los instrumentos deben validarse antes de su uso.

9.4 General

- En todos los procedimientos debe utilizarse agua de alta calidad obtenida por desionización, destilación u ósmosis inversa.
- Centrífuga de microplacas capaz de alcanzar de 2750 g a 3205 g.
- Agitador de frascos para contribuir a la disolución del polvo de la solución de lavado Enfer 1 (opcional)
- Película selladora de las microplacas (07K34-70) †
- Micropipetas y micropipetas multicanal de volumen adecuado y puntas desechables.
- Dispensador de reactivos de volumen variable y frasco para el tampón Enfer 1
- Balanza de plato superior, con exactitud de hasta 2 decimales
- Hojas de disección o herramienta de corte de muestras Enfer (07K34-60)
- Bandejas para pesar
- Depresores
- Recipientes de vidrio para la dilución de los anticuerpos primario y secundario.
- Recipientes de vidrio o de polipropileno para diluir los otros reactivos

Solución para parar la reacción (ácido sulfúrico 0,5mol/l). Añada 3 ml de ácido sulfúrico concentrado de grado analítico (18,0 mol/l), a unos 80 ml de agua obtenida por destilación, desionización u ósmosis inversa y complete el volumen hasta 100 ml con más agua.

*Los aparatos de los fabricantes especificados son indispensables para realizar el análisis. Póngase en contacto con su representante local para obtener más información sobre los sistemas recomendados y los protocolos de los sistemas informáticos para los instrumentos y los procedimientos de validación.

† Recomendado. Pueden usarse puntas de pipeta y película selladora de microplacas alternativos, pero deben ser validados por el usuario.

10.0 Parámetros para la configuración de los instrumentos

Los siguientes parámetros deben programarse en los instrumentos recomendados. No se han validado otros instrumentos.

10.1 Lavador

Se necesitan 2 lavadores individuales para realizar esta prueba.

Configuración para ambos protocolos:

Presión del aire: 0,25 bar

Volumen/flujo, compensación de adaptación >> ρv :1.00

Posición de aspiración: programar para que el pocillo esté completamente vacío

Posición de dispensación: programar para que el líquido que se dispensa en el pocillo forme un menisco positivo

Protocolo 1 (utilizado con la solución de lavado Enfer 1 y el lavador 1. Este lavado se debe llevar a cabo en una campana de seguridad biológica)			Protocolo 2 (utilizado con la solución de lavado Enfer 2 y el lavador 2)		
1	Aspiración	6 segundos	1	Aspiración	4 segundos
2	Dispensación	300 μ l	2	Lavado	3 segundos
3	Remojo	5 segundos	3	Remojo	5 segundos
4	Aspiración	4 segundos	4	Aspiración	2 segundos
5	Lavado	5 segundos	5	Lavado	3 segundos
6	Remojo	5 segundos	6	Remojo	5 segundos
7	Aspiración	3 segundos	7	Aspiración	2 segundos
8	Lavado	2,5 segundos	8	Lavado	3 segundos
9	Remojo	5 segundos	9	Remojo	5 segundos
10	Aspiración	2 segundos	10	Aspiración	2 segundos
11	Lavado	2 segundos	11	Lavado	2 segundos
12	Remojo	5 segundos	12	Remojo	5 segundos
13	Aspiración	5 segundos	13	Aspiración	4 segundos
14	Fin del lavado		14	Fin del lavado	

10.2 Incubador/agitador: nivel de agitación 3, 34 °C. Programe el intervalo y el tiempo de agitación en 24 horas.

10.3 ETDS VIII: preprogramado para homogeneizar durante 10 segundos.

11.0 Preparación de los reactivos

Para la preparación de los reactivos debe utilizarse agua de alta calidad obtenida por desionización, destilación u ósmosis inversa. Debe dejarse que todos los reactivos alcancen una temperatura entre 18 °C y 30 °C antes de la preparación de los reactivos.

Componente	Método	Conservación de los reactivos preparados
Solución de lavado Enfer 1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prepare la solución de lavado Enfer 1 agregando 50 g de sólido por litro de agua. 2. Mezcle manualmente o mediante un dispositivo de mezclado adecuado hasta que se disuelva. 	1 mes entre 10 °C y 30 °C
Solución de lavado Enfer 2, a la concentración de trabajo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Asegúrese de que el tampón no contiene cristales y está bien mezclado antes de utilizarlo. Si hay cristales, se recomienda la incubación a 30 °C; no supere los 37 °C. 2. Diluya en agua la solución de lavado Enfer 2 concentrada en una proporción de 1 a 10. 3. Mezcle bien. <p>Por ej., para 4 l de solución de lavado Enfer 2 a la concentración de trabajo, añada 400 ml de concentrado a 3 600 ml de agua.</p>	<p>2 semanas entre 10 °C y 30 °C</p> <p>1 mes entre 2 °C y 8 °C</p>
Tampón Enfer 1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Asegúrese de que el tampón no contiene cristales y está bien mezclado antes de utilizarlo. Si hay cristales presentes, incube entre 17 °C y 28 °C. Agitar el tampón con un agitador suspendido ayudará a la disolución. 	Como se indica en la etiqueta
<p>Anticuerpo primario, a la concentración de trabajo</p> <p>Se necesita:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diluyente de anticuerpos 2. Anticuerpo primario 3. Suero normal de cabra (SNC) 	<p>Prepare sólo el volumen necesario para el número de análisis a realizar. Se necesita 1 ml de anticuerpo primario a la concentración de trabajo para 8 pocillos. Por lo tanto, se necesitan 12 ml de anticuerpo primario a la concentración de trabajo para 1 placa.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Descongele el anticuerpo primario completamente y mezcle por inversión. 2. Diluya SNC en el diluyente para anticuerpos en una proporción de 1 a 500. 3. Diluya anticuerpo primario en el diluyente de anticuerpos más el SNC en una proporción de 1 a 500. 4. Mezcle por inversión. Invierta un mínimo de 8 veces. <p>Por ej., a 12 ml de solución de diluyente de anticuerpos, añada 24 µl de SNC y 24µl de anticuerpo primario.</p> <p>Nota:</p> <p>Vuelva a almacenar el anticuerpo primario a la concentración de trabajo y todo el SNC no utilizado a una temperatura entre 2 °C y 8 °C y el anticuerpo primario no utilizado entre -25 °C y -15 °C después del uso.</p>	Almacénelo entre 2 °C y 8 °C y utilícelo en las 8 horas siguientes a la preparación.

Componente	Método	Conservación de los reactivos preparados
<p>Anticuerpo secundario a la concentración de trabajo</p> <p>Se necesita:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diluyente de anticuerpos 2. Anticuerpo secundario 3. Suero normal de cabra (SNC) 	<p>Prepare sólo el volumen necesario para el número de análisis a realizar. Se necesita 1 ml de anticuerpo secundario a la concentración de trabajo para 8 pocillos. Por lo tanto, se necesitan 12 ml de anticuerpo secundario a la concentración de trabajo para 1 placa.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diluya SNC en el diluyente de anticuerpos en una proporción de 1 a 500. 2. Diluya el anticuerpo secundario en el diluyente de anticuerpos más el SNC en una proporción de 1 a 2 000. 3. Mezcle por inversión. Invierta un mínimo de 8 veces. <p>Por ej., a 12 ml de solución de diluyente de anticuerpos, añada 24 µl de SNC y 6 µl de anticuerpo secundario.</p> <p>Nota: Vuelva a almacenar el anticuerpo secundario, el diluyente de anticuerpos y el SNC no usado a una temperatura entre 2 °C y 8 °C después de su uso.</p>	<p>Almacénelo entre 2 °C y 8 °C en la oscuridad y utilícelo en las 8 horas siguientes a la preparación.</p>
<p>Solución de TMB</p>	<p>Prepare sólo el volumen necesario para el número de análisis a realizar. Se necesita 1 ml de solución de TMB para 8 pocillos. Por lo tanto, se necesitan 12 ml de solución de TMB para 1 placa.</p> <p>Añada un volumen de diluyente de TMB incoloro a un volumen igual de concentrado de TMB de color rosa en un recipiente de vidrio o plástico limpio. De forma alternativa, la solución de TMB puede prepararse vertiendo todo el contenido del frasco de diluyente de TMB en el frasco de concentrado de TMB.</p> <p>Notas:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) Es importante que se siga este orden de adición y que todas las pipetas e instrumentos de vidrio empleados para preparar la solución de TMB estén limpios. b) La solución de TMB debe ser rosa; si se torna morada antes de usarse, debe desecharse y prepararse solución de TMB nueva. c) La solución de TMB debe desecharse si se han formado cristales. 	<p>Almacene la solución de TMB entre 2 °C y 8 °C o entre 15 °C y 25 °C protegida de la luz del sol y úsela en los dos días siguientes a la preparación.</p>

12.0 Preparación de los controles tisulares

Debe dejarse que los controles tisulares positivos y negativos alcancen la temperatura ambiente (entre 18 °C y 30 °C) antes de la homogeneización en tampón Enfer 1.

12.1 Control tisular negativo

Se recomienda el uso de control tisular negativo cuando no se analicen muestras de cribado rutinario, por ejemplo, en evaluaciones de análisis en las que la mayoría de las muestras pueden ser positivas o diluciones de tejidos positivos; en la repetición de resultados inicialmente reactivos, tejidos con sospecha de ser positivos o con fines de investigación.

Prepare un corte de tejido del sistema nervioso central negativo para EET de la misma manera que una muestra normal y procéselo de acuerdo con el protocolo de inmunoensayo que aparece a continuación. Los controles de tejido del sistema nervioso central negativos para EET pueden congelarse entre -25 °C y -15 °C. Una vez descongelado, el control tisular negativo no debe volver a congelarse y debe utilizarse el mismo día que se descongeló.

12.2 Control tisular positivo

Deben usarse los pocillos indicadores de péptidos facilitados en el equipo, pero puede usarse también un control tisular positivo.

Debe utilizarse tejido intacto almacenado a una temperatura igual o inferior a -15 °C. Póngase en contacto con su representante local si necesita un protocolo de homogeneización.

El tejido positivo para EEB es infeccioso y debe manipularse según procedimientos de seguridad estrictos.

13.0 Procedimiento de preparación de la muestra

La toma de muestras y el análisis en el laboratorio deben seguir la Reglamentación (CE) N° 999/2001, Anexo X, Capítulo C, en lo referente a la toma de muestras, que remite a la última edición del "Manual de Normas para ensayos diagnósticos y vacunas" de la Oficina Internacional de Enfermedades Epizooticas (OIE) donde se indica: "La muestra preferida para este inmunoensayo debe provenir del Obex o del lugar más cercano posible al Obex, pero no de un punto más de 1,5 cm anterior a éste." Véase la figura 1 en el Apéndice I.

Para cada muestra, es necesario utilizar una cuchilla o una herramienta de corte de muestras Enfer, un depresor, una bandeja para pesar y una bolsa de homogeneización o un tubo de muestras ETDS nuevos para evitar las contaminaciones cruzadas.

Pegue una etiqueta sobre el tubo de muestras ETDS o la bolsa de homogeneización con la identificación de la muestra que contiene; en el caso de la bolsa de homogeneización la etiqueta indicará entonces la parte frontal de la bolsa.

Debe dejarse que las muestras alcancen la temperatura ambiente (entre 18 °C y 30 °C) antes de cortarlas.

Usando una cuchilla o una herramienta de corte de muestras Enfer, tome una muestra de tejido del sistema nervioso central que incluya materia gris. La muestra debe pesar aproximadamente 1,0 g; no use menos de 0,5 g ni más de 1,6 g de tejido para preparar el homogeneizado. Es necesario determinar el peso de la muestra.

La herramienta de corte de muestras Enfer no es adecuada para las muestras autolisadas. Véase el Apéndice I para obtener más información sobre el uso de la herramienta de corte de muestras Enfer.

Si la muestra pesa menos de 0,5 g, se debe tomar otra muestra.

Nota: Después de la recogida de muestras, debe quedar disponible una hemisección completa del tronco cerebral con una región del Obex intacta para poder realizar análisis de confirmación.

13.1 Método A - homogeneización manual

1. Pese la muestra y colóquela *delante* del filtro en la bolsa de homogeneización, verificando que la muestra llegue al fondo de la bolsa. Aplaste la muestra entre el pulgar y el índice para facilitar la posterior homogeneización.
2. Añada 12,5 ml de tampón Enfer 1 por cada gramo de tejido a la bolsa de homogeneización. El dispensador del tampón no debe tocar la bolsa para evitar la contaminación cruzada de las muestras.
3. Homogeneice la muestra durante 2 minutos a velocidad "alta" en un homogeneizador Stomacher®. En cada ocasión puede usarse un máximo de dos bolsas de homogeneización en el Stomacher®. Verifique que la muestra de tejido se ha deshecho totalmente y que se puede ver una solución de color marrón claro detrás del filtro. El ensayo se verá alterado si este paso no se realiza correctamente. Repita la homogeneización si es necesario.
4. Deje que la bolsa de homogeneización repose entre cinco y diez minutos para permitir que desaparezcan las burbujas antes de continuar.

13.2 Método B - homogeneización automatizada

1. Pese la muestra y colóquela dentro del tubo externo de un tubo de muestras ETDS desmontado. Para montarlo, inserte el eje molidor para atrapar la muestra entre las superficies molidoras y cierre la tapa desechable presionando hasta que oiga un chasquido.
2. Coloque los tubos de muestras ETDS en la gradilla del homogeneizador asegurándose de que están alineados correctamente. Añada 12,5 ml de tampón Enfer 1 por cada gramo de tejido a cada tubo de muestras ETDS. Coloque la gradilla del homogeneizador en su posición en el ETDS VIII y homogeneice durante 10 segundos.
3. Deje que el tubo de muestras ETDS repose entre cinco y diez minutos después de la homogeneización para permitir que desaparezcan las burbujas antes de continuar.

Con fines de cribado, no conserve las muestras homogeneizadas, úselas en las 3 horas siguientes a la preparación.

Para estudios de confirmación exclusivamente, cuando los procedimientos locales lo permitan, los homogeneizados deben conservarse a temperatura ambiente y pueden volverse a analizar durante 7 días. Debe tenerse mucho cuidado al interpretar estos resultados, ya que se produce una disminución de la señal con el tiempo y los resultados positivos bajos obtenidos en el laboratorio de cribado podrían convertirse en negativos. Los reanálisis deben incluir un corte de tejido nuevo analizado con ELISA, Western Blot y/o IHQ.

14.0 Procedimiento del inmunoensayo – (Véase también el Apéndice 2)

Lea atentamente el apartado “Precauciones analíticas” antes de realizar el ensayo.

*Todos los reactivos, incluyendo las soluciones de lavado, las placas de ensayo Enfer, los pocillos de indicación de péptidos y las placas para centrífuga, deben encontrarse a temperatura ambiente (entre 18 °C y 30 °C) antes de empezar el ensayo. El tampón Enfer 1 y la solución de lavado Enfer 2 deben encontrarse a temperatura ambiente (entre 18 °C y 30 °C) y **no contener cristales** antes de empezar el ensayo. Si se observan cristales, se recomienda incubar entre 17 °C y 28 °C el tampón Enfer 1 y a 30 °C el concentrado de la solución de lavado Enfer 2. Agitar el tampón con un agitador ayudará a la disolución. Es muy recomendable conservar estos tampones en recipientes transparentes, de manera que cualquier cristal sea fácilmente visible.*

1) Pipeteo manual

Dispense 180 µl de tampón Enfer 1 por cuadruplicado como pocillos de control blanco. Dispense también 180 µl de cada muestra por duplicado y 180 µl de controles (si se van a analizar) por duplicado en la placa de centrífuga. Debe usarse la placa de centrífuga facilitada con el equipo. No añada ninguna muestra o control a las posiciones A1 y A2.

Siempre debe pipetear detrás del filtro en la bolsa de homogeneización. Tenga cuidado de no contaminar la superficie exterior de la pipeta con material del interior de la bolsa. Verifique que sólo la punta desechable se introduce en la bolsa.

o

1*) Pipeteo automatizado

Dispense 350 µl de tampón Enfer 1 por cuadruplicado como pocillos de control blanco. Dispense también 350 µl de cada muestra por duplicado y 350 µl de controles (si se van a analizar) por duplicado en la placa de centrífuga de pocillos profundos. No añada ninguna muestra o control a las posiciones A1 y A2.

Si utiliza el tubo de muestras ETDS, pipetee en el tubo interno del eje molidor. Verifique que sólo la punta desechable se introduce en el tubo.

- 2) Cubra la placa con una película selladora de microplacas.
- 3) Centrifugue la placa a 2 750 g durante 5 minutos entre 18 °C y 30 °C.
- 4*) Agregue 20 µl de tampón Enfer 2 a todos los pocillos de la placa de ensayo Enfer. Es muy importante que este tampón se deposite bien en el fondo de los pocillos, ya que tiene tendencia a adherirse a las paredes de los pocillos y esto debe impedirse.
- 5*) Retire la película selladora de la microplaca y transfiera 100 µl de cada muestra centrifugada, tampón Enfer 1 (control blanco) y controles tisulares a la posición correspondiente en la placa de ensayo Enfer que contiene tampón Enfer 2. Manipule la placa de centrífuga con mucho cuidado para evitar alterar el sedimento y tenga cuidado de no transferir material sólido a la placa de ensayo Enfer.
- 6) Cubra la placa con una película selladora de microplacas.
- 7) Incube la placa a 34 °C durante 50 minutos con agitación.
- 8) Retire la película selladora de la microplaca y lave la placa con la solución de lavado Enfer 1 siguiendo el protocolo de lavado 1.
- 9) Invierta la placa sobre una pila de papel absorbente y golpee para eliminar todo el líquido restante.
- 10) Agregue 100 µl de tampón Enfer 3 a todos los pocillos.
- 11) Incube la placa a 34 °C durante 15 minutos con agitación.

- 12) Lave la placa usando la solución de lavado Enfer 2 y el protocolo de lavado 2.
- 13) Invierta la placa sobre una pila de papel absorbente y golpee para eliminar todo el líquido restante.
- 14) Retire los pocillos de las posiciones A1 y A2 de la placa de ensayo Enfer y sustitúyalos por pocillos indicadores de péptidos.
Es muy importante asegurarse de que estos pocillos se insertan adecuadamente.
Compruebe que la parte superior de los pocillos está al mismo nivel que la parte superior de los otros pocillos de la placa.
- 15) Dispense 100 µl de anticuerpo primario a la concentración de trabajo en cada pocillo.
- 16) Incube la placa a 34 °C durante 30 minutos con agitación.
- 17) Lave la placa usando la solución de lavado Enfer 2 y el protocolo de lavado 2.
- 18) Invierta la placa sobre una pila de papel absorbente y golpee para eliminar todo el líquido restante.
- 19) Dispense 100 µl de anticuerpo secundario a la concentración de trabajo.
- 20) Incube la placa a 34 °C durante 30 minutos con agitación.
- 21) Lave la placa usando la solución de lavado Enfer 2 y el protocolo de lavado 2.
- 22) Invierta la placa sobre una pila de papel absorbente y golpee para eliminar todo el líquido restante.
- 23) Añada 100 µl de solución de TMB a cada pocillo.
- 24) Incube la placa a 34 °C durante 30 minutos con agitación.
- 25) Añada 100 µl de la solución para parar la reacción a cada pocillo.
- 26) En 30 minutos después de añadir la solución para parar la reacción, agite la placa durante 10 segundos sobre el lector y luego lea la absorbancia a 450 nm usando una longitud de onda de referencia de 690 nm. Ajuste el blanco del lector con aire (sin placa en el transportador).

*Puede usarse el sistema de pipeteo automático Tecan Genesis RSP®/ Freedom EVO® para estos pasos. Póngase en contacto con su representante local para recibir protocolos validados.

El procesamiento de la placa de ensayo puede automatizarse usando el sistema en4lisa, como se indica a continuación:

- i) Termine el procedimiento de inmunoensayo hasta el paso 3 inclusive
- ii) Añada los pocillos indicadores de péptidos (paso 14)
- iii) Retire la película selladora de la placa para centrifuga y transfiera 100 µl de cada muestra centrifugada, el tampón Enfer 1 (control blanco) y los controles tisulares a la posición correspondiente en la placa de ensayo Enfer. Manipule la placa para centrifuga con mucho cuidado para evitar alterar el sedimento y tenga cuidado de no transferir ningún material sólido a la placa de ensayo Enfer.
- iv) Transfiera la placa de ensayo Enfer al sistema en4lisa
- v) El sistema en4lisa añade tampón Enfer 2 (Paso 4) y termina el procedimiento del inmunoensayo desde el paso 7 en adelante.

Póngase en contacto con su representante local para obtener más información y para recibir protocolos validados.

La adición de reactivos puede confirmarse usando un lector de microplacas o el sistema en4lisa como se indica a continuación: tampón Enfer 2 a 620/690 nm, tampón Enfer 3 a 405/690 nm, diluyente de anticuerpos a 492/690 nm y solución de TMB a 492 nm.

Para garantizar un funcionamiento adecuado, las temperaturas de incubación deben ser de 34 °C +/-2 °C.

El volumen del tampón Enfer 1 añadido debe estar dentro del +/-5% de los valores calculados. Se espera que todos los demás volúmenes pipeteados estén dentro del +/-10% del volumen indicado, los siguientes son los volúmenes indicados con el intervalo permitido entre paréntesis, 100 µl (90 a 110 µl), 20 µl (18 a 22 µl) y 350 µl (315 a 385 µl). Los tiempos de incubación no pueden reducirse y deben ser exactos dentro de un margen de +10%. La centrifugación debe realizarse con una fuerza en el intervalo de 2 750 a 3 025 g entre 5 y 10 minutos.

15.0 Resultados

15.1 Validación del ensayo

Cada placa debe considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados del ensayo. Puede utilizarse un software aprobado para el cálculo y la interpretación de los resultados. Los resultados de los controles deben validarse antes de interpretar los resultados de las muestras.

Control del blanco

El control del blanco se obtiene calculando la mediana de la absorbancia de los cuatro replicados de los pocillos de control blanco de tampón Enfer 1. La mediana es la media aritmética de los dos valores medios cuando los datos se disponen en orden numérico.

La mediana de la absorbancia de los replicados del control blanco debe ser inferior a 0,2.

Punto de corte

Calcule el punto de corte añadiendo 0,3 al control blanco.

Pocillos indicadores de péptidos

Calcule la absorbancia media de los replicados de los pocillos indicadores de péptidos menos el control blanco.

La absorbancia media menos el control blanco, de los pocillos indicadores de péptidos, debe ser superior a 0,8.

Controles tisulares negativos

Si se analiza un control negativo, calcule la absorbancia media de los replicados, la media menos el control blanco debe tener un valor igual o inferior a 0,3.

Intervalo aceptable de los resultados de control:

Si estos criterios no se cumplen, el ensayo no es válido y debe repetirse.

15.2 Interpretación de los resultados

Resultados no reactivos

Las muestras que presenten una absorbancia inferior o igual al valor del punto de corte se consideran no reactivas según el ensayo Enfer TSE Versión 3.

Resultados reactivos

Las muestras que presenten una absorbancia en uno o ambos pocillos superior al valor del punto de corte se consideran inicialmente reactivas con el ensayo (véanse las limitaciones del procedimiento). Estas muestras deben volver a analizarse por duplicado, partiendo del tejido. Una muestra se

considera positiva cuando los resultados de la repetición del análisis dan una señal superior al valor del punto de corte en uno o ambos pocillos.

Las muestras del tejido correspondiente que da resultados positivos deben enviarse al LNR local para su confirmación.

15.3 Límites del procedimiento

Enfer Scientific cumple con la norma de calidad ISO9001.

Como ocurre con todos los ensayos biológicos, este ensayo puede dar resultados falsos positivos o negativos debidos a determinadas circunstancias. Un ensayo debe interpretarse teniendo en cuenta toda la información clínica, histórica y epidemiológica disponible sobre el o los animales estudiados. En determinadas circunstancias, pueden ser necesarios otros análisis de confirmación.

La obtención de resultados negativos con un método inmunológico cualitativo no descarta la posibilidad de infección con la proteína priónica PrP^{Sc}.

Cualquier cambio o modificación del procedimiento puede alterar los resultados.

Los datos obtenidos para el material positivo de EET pueden variar, ya que la distribución de los priones en el tejido varía y no se puede garantizar la estabilidad del tejido almacenado.

La responsabilidad de la interpretación del ensayo y las decisiones consecuentes en cuanto a la gestión de los animales quedan en manos del usuario, del veterinario y de las autoridades o asesores sanitarios correspondientes. Enfer Scientific no acepta ninguna responsabilidad por cualquier pérdida o daño, cualquiera que sea la causa, que puedan derivar de la interpretación de los resultados del ensayo.

16.0 Descargo de responsabilidad y reserva de derechos

Enfer Scientific no da ningún tipo de garantía, explícita o implícita, con respecto a la realización del ensayo diagnóstico Enfer TSE Versión 3, a la estabilidad y conservación del equipo Enfer o al procedimiento utilizado. Sin perjuicio de lo anterior, Enfer Scientific se descarga de toda responsabilidad relativa a la comercialización y a la aptitud para el uso del ensayo una vez fuera de Enfer Scientific. Enfer Scientific no se hará responsable, en ninguna circunstancia, de daños directos o indirectos.

17.0 Diagrama recomendado de la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
B	B	B	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
C	B	B	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
D	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
E	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
F	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
G	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44
H	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37	S45	S45

P = Pocillos indicadores de péptidos

B = Pocillos de control blanco con tampón Enfer 1.

S = Muestras a analizar por duplicado

Bronidox[®], Stomacher[®], Skanwasher[®], Tecan Genesis RSP[®] o Tecan Freedom EVO[®] no son marcas comerciales de Enfer.

C056L72ES Noviembre de 2010

Código de autorización para español: 0887:RD

Apéndice I

Instrucciones para la toma de muestras de tejido usando la herramienta de corte de muestras Enfer (07K34-60)

Materiales necesarios:

Herramienta de corte de muestras Enfer (de ahora en adelante “herramienta de corte”)

Muestras de tejido

Bandejas para pesar desechables o bandejas para las muestras

Espátulas o depresores desechables

Tubos de muestras ETDS o bolsas de homogeneización

Nota: Este método sólo debe ser llevado a cabo por técnicos con experiencia

Método:

1. Use una herramienta de corte, una bandeja para pesar y un depresor nuevos para cada muestra con el fin de evitar la contaminación cruzada.
 2. Coloque la muestra en una bandeja e identifique el área del que desea tomar la muestra. Esta debe estar en un lateral del Obex, como se muestra en la Figura 1.
 3. Coloque la herramienta de corte sobre el área de la que va a tomar la muestra, con el extremo cortante biselado hacia el tejido.
 4. Use la espátula o el depresor desechables para sujetar el tejido. Corte el tejido presionando suavemente la herramienta de corte hacia abajo al mismo tiempo que la gira aproximadamente un cuarto de vuelta en sentido horario y antihorario. Véase la Figura 2.
 5. El instrumento cortará una pieza cilíndrica de tejido. Véase la Figura 3. El tejido normalmente queda dentro del instrumento de corte.
 6. Para transferir el tejido a un tubo de muestra ETDS, golpee suavemente el borde de la herramienta de corte contra el borde del tubo de muestra ETDS; esto generalmente es suficiente para soltar el tejido. En caso de que quede tejido dentro del instrumento de corte, suéltelo presionando con una espátula a través de las aberturas laterales (Nota: Tare la balanza con el tubo exterior vacío antes de añadir la muestra).
- O Para transferir el tejido a una bolsa de homogeneización, coloque el extremo del instrumento de corte con el tejido dentro de la bolsa de homogeneización y suelte el tejido presionando con una espátula a través de las aberturas laterales en el instrumento de corte (Nota: Tare la balanza con la bolsa vacía antes de añadir la muestra). Asegúrese de que la muestra está en el fondo de la bolsa de homogeneización antes de continuar el procesamiento.

Notas: 1) Después de la recogida de muestras, debe quedar disponible una hemisección completa del tronco cerebral con una región del Obex intacta para poder realizar análisis de confirmación.

2) La herramienta de corte de muestras Enfer no es adecuada para muestras autolisadas.

Figura 1.

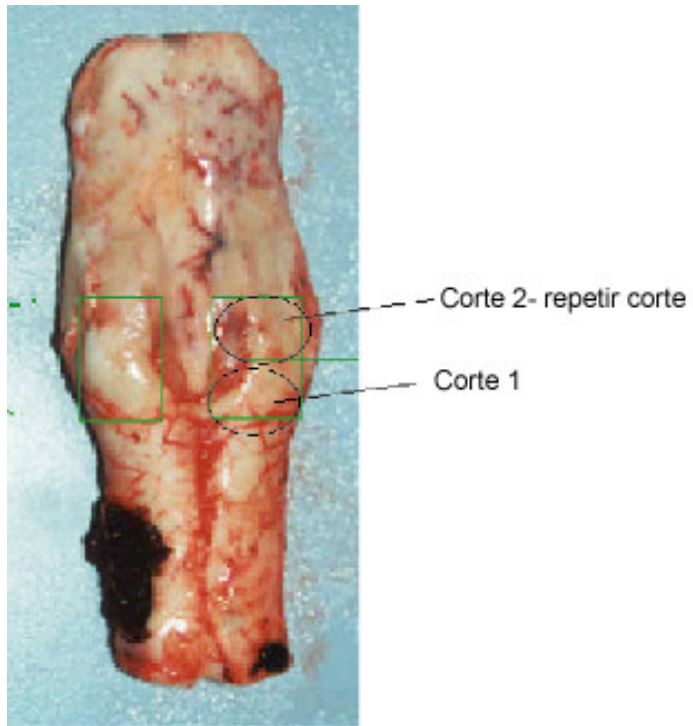


Figura 2



Figura 3



Apéndice II

Opciones de los procedimientos manual y automatizado

En la tabla siguiente se muestran las posibles combinaciones disponibles para realizar el ensayo con diversos grados de automatización.

		Opción					
		1	2	3	4	5	6
Paso del ensayo	Corte de la muestra	Herramienta de corte de muestras Enfer u hoja de disección					
	Homogeneización	Seward Stomacher® o Homogeneizador Interscience (Método A)		ETDS VIII (Método B)			
	Transferencia del homogeneizado a la placa de centrifuga	Manual	Manual	Manual	Tecan Genesis RSP® o Freedom EVO®	Manual	Tecan Genesis RSP® o Freedom EVO®
	Transferencia del homogeneizado centrifugado a la placa de ensayo						
	Adición del tampón Enfer 2		en4lisa			Manual	
	Procesamiento de la placa de ensayo						
Aprobado para		Sólo ganado bovino		Solo ganado bovino,			