

# BRUCELLA LPS iELISA

## KIT DE PRUEBA DE ANTICUERPOS BRUCELLA S, LPS iELISA

El BRUCELLA S ANTIBODY TEST KIT, LPS iELISA es una prueba semicuantitativa que utiliza tecnología ELISA indirecta. La prueba determina la presencia de anticuerpos contra especies de *Brucella* que producen cepas lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, y *B. suis* - Rev. Ciencia. Tech., OIE 1982) en muestras individuales de suero/plasma o de suero bovino agrupado (grupos de un máximo de 5 muestras - Directiva 64/432/CEE del Consejo de la UE, Anexo C), muestras individuales de suero de oveja/cabra y leche individual muestras de ganado. La presencia de anticuerpos indica una infección por *Brucella* reciente.

La prueba diagnóstica utiliza placas de microtitulación que contienen pocillos recubiertos con lipopolisacárido (LPS) extraídos de la bacteria *Brucella abortus*. Cualquier anticuerpo anti-*Brucella* presente en la muestra se unirá al LPS recubierto en la placa. Después de un paso de lavado posterior, los anticuerpos conjugados secundarios de HRP (conjugados) se unirán a cualquier anticuerpo inmovilizado en los pocillos. Después de otro paso de lavado, cualquier conjugado unido se detecta utilizando un sustrato TMB que produce color en la presencia de HRP. Se utiliza un lector de microplacas para medir la densidad óptica del color producido. La cantidad de color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-*Brucella* específicos en el suero animal o la muestra de leche.

# Contenido del kit

---

Reactivos	Kit de 2 placas	Kit de 5 placas
<b>Control Positivo</b>	0.5 ml	1 ml
<p>Listo para usar; suero bovino positivo contra <i>Brucella abortus</i>. Contiene 0.095% de azida de sodio como conservante. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
<b>Control Negativo</b>	0.5 ml	1 ml
<p>Listo para usar; suero negativo bovino contra <i>Brucella spp.</i> Contiene 0.095% de azida de sodio como conservante. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
<b>Diluyente de muestra</b>	60 ml	120 ml
<p>Listo-para-usar; fórmula patentada que contiene suero animal. Diluyente de muestra que contiene 0.1% ProClin 300 como conservante. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
<b>Conjugado 100X</b>	0.5 ml	1 ml
<p>Una fórmula patentada que contiene anticuerpos animales purificados. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
<b>Sustrato</b>	30 ml	70 ml
<p>Listo-para-usar; Solución TMB tamponada. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
<b>Buffer de lavado 10X</b>	100 ml	2 x 100 ml
<p>Una fórmula patentada que contiene 0.1% ProClin 300. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
<b>Diluyente Conjugado</b>	30 ml	70 ml
<p>Una fórmula patentada que contiene albúmina sérica animal. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
<b>Placa recubierta de LPS Brucella</b>	2 placas	5 placas
<p><i>Brucella abortus</i> LPS recubierto sobre microplacas. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		

Listo-para-usar; solución ácida de baja concentración.

Código de peligro: **R35** - Causa quemaduras graves; **S26** - En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque consejo médico;

**S36/37/39** - Use ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos/cara; **S45** - En caso de accidente o si se siente mal, busque consejo médico de inmediato (muestre la etiqueta en el vial).

---

## Materiales requeridos, pero no proporcionados

---

- Micropipetas y puntas de dosificación simples y múltiples de precisión para volúmenes entre 10 y 1000  $\mu\text{l}$  (por *ejemplo*, pipetas individuales 10-100 y 100-1000  $\mu\text{l}$  y pipetas multicanal 5-50 y 50-300  $\mu\text{l}$ )
- Tubos de ensayo o placas de transferencia recubiertas sin antígeno para diluir muestras
- Botellas de plástico o vidrio con taparrosca y, vasos de precipitados de laboratorio o matraces Erlenmeyer para preparar el Buffer de lavado
- Depósitos de reactivos para transferir reactivos a placas
- Lector de microplacas ELISA o espectrofotómetro equipado con un filtro de 450 nm
- Agua desionizada o destilada para formar el 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 vortex

Para suministros, póngase en contacto 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. El kit se transporta en una caja refrigerada a una temperatura entre 0 y 15°C.

No utilice componentes después de la fecha de caducidad. No mezcle reactivos de diferentes lotes de kits. No exponga la solución de TMB a agentes ligeros u oxidantes fuertes. Manipule la solución TMB con un vaso limpio o de 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.
- La azida de sodio es una sustancia tóxica, y se utiliza en algunos reactivos. En caso de contacto con los ojos o la piel, enjuague inmediatamente con abundante cantidad de agua. La 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.
- La Solución de parada contiene ácido diluido. Utilizar con cuidado y 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 inmediatamente.

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 Brucella LPS iELISA de Ellie se puede realizar con muestras de suero o plasma de ganado, muestras de ovejas y cabras y muestras de leche de ganado.

### **Muestras de suero y plasma**

La prueba utiliza sólo 20µl de muestra por prueba duplicada. Recolectar la cantidad de sangre requerida por el sistema de recolección de sangre.

Recolectar asépticamente sangre en tubos no tratados, tubos separadores de suero o tubos de Li-Heparina. Permita que la sangre coagule y separe el suero. Centrifugue la sangre recolectada con tubos de Li-Heparina a un mínimo de 4500 RPM durante 5 minutos y separa el plasma. Evite el uso de muestras muy hemolizadas o contaminadas. Almacene las muestras a 2-8°C. Congelar muestras a -20°C si no se analizan dentro de las 72 horas; evitar la congelación repetida.

### **Muestras de leche**

La prueba utiliza sólo 100 µl de leche por prueba duplicada. No use muestras de calostro o leche hasta 20 días después del parto para analizar muestras de leche individuales debido a reacciones inespecíficas. Las muestras de leche individuales deben ser seleccionadas antes del proceso de ordeño. Recolecte las muestras de leche del cuarto sano de la ubre tirando los primeros 5-10 chorros de leche y luego recoja la muestra.

Las muestras de leche deben transportarse en una caja refrigerada a una temperatura entre 0 y 15°C. Para el almacenamiento a corto plazo hasta 3 días, mantenga las muestras de leche a 2-8°C. Para el almacenamiento a largo plazo, mantenga las muestras de leche a -20°C.

## 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. El tiempo mínimo necesario para hacer esto es de 2 horas. Es muy importante calentar el diluyente de muestra y el buffer de lavado a temperatura ambiente antes de su uso.

Remover la placa recubierta de antígeno de la bolsa de aluminio. Si se utilizan placas parciales, sólo se retira el número de pocillos necesarios para analizar todas las muestras. Coloque los pocillos restantes de nuevo en la bolsa y devuélvalos a 2-8 °C.

#### Preparación del Buffer de lavado

Prepare Buffer de lavado mezclando una parte 10X Buffer de lavado 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 una placa es de 300 ml. Guarde el Buffer de lavado a temperatura ambiente hasta un mes.

#### Preparación conjugado

Diluya el conjugado 100X concentrado 1:100 con diluyente de conjugado, combinando una parte de Conjugado 100X con 99 partes de diluyente de conjugado (p. ej., la cantidad necesaria para una placa se prepara mezclando 110 µl de conjugado concentrado y 10,89 ml de diluyente de conjugado) y mezcle bien.

Regrese 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 que se prepara.

### *Preparación de Muestras y Controles*

Mezcle bien las muestras antes de la prueba. Las muestras hemolizadas son aceptables para las pruebas. Las muestras liofilizadas deben ser reconstituidas por completo, y las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse por completo.

Pre diluir controles y muestras individuales de suero/plasma o suero agrupado (compuestas por un máximo de 5 muestras de suero) 1:10 en Diluyente de muestra (por *ejemplo*, 10 µl de controles o muestras en 90 µl de Diluyente demuestra). Utilice placas de transferencia o microtubos. Mezclar bien antes de seguir procesando. Para microplacas, use un agitador de placas; para los tubos, use un vortex, si está disponible. Las muestras de leche deben analizarse sin diluir.

## Procedimiento de prueba

---

1. Cargue las muestras en una placa recubierta de Brucella LPS.

*Controles, muestras de suero y plasma:*

Pipetee 90 µl de diluyente de muestra en todos los pozos de prueba de placa recubierta de Brucella LPS. Agregue inmediatamente 10 µl de muestras y controles pre diluidos en sus respectivos pozos. Pipeteé controles por duplicado para cada placa.

*Muestras de leche individual:*

Pipetee 50 µl del diluyente de muestra en todos los pozos de prueba de placa recubierta de Brucella LPS. Añadir 50 µl de cada muestra de leche sin diluir.

NOTA: Si hay un gran número de muestras de leche individuales para ser analizadas, transfiera las muestras a una placa de transferencia primero. Mezcle bien cada muestra de leche a mano justo antes de agregarla a su respectivo pozo en la placa de transferencia. Utilice una pipeta multicanal para pipetear las muestras de leche en los pozos de prueba de la placa recubierta de Brucella LPS. Mezclar las muestras de leche por pipeteo, con puntas multicanal 1-3 veces e inmediatamente pipetear la cantidad adecuada en los pozos de prueba.

Si las muestras de leche se agregan directamente a los pozos de prueba de la placa recubierta Brucella LPS, mezcle las muestras a mano justo antes de agregarlas a los pozos de prueba.

2. Mezcle bien la placa de prueba antes de seguir procesando. Use un agitador de placas si está disponible.

3. Incubarlo durante 30-40 minutos a temperatura ambiente.

4. Lavar el plato:

- Deseche el contenido de la placa.
- Lavar cuatro veces con  $300 \pm 20$  µl de buffer de lavado.
- Golpee firmemente la placa sobre el papel absorbente después del último paso de lavado.

5. Dispensar 100 µl de Conjugado en cada pozo.

6. Incubarlo durante 30-40 minutos a temperatura ambiente.

7. Lavar la placa:

- Deseche los componentes de la placa.
- Lavar cuatro veces con  $300 \pm 20$  µl de buffer de lavado.
- Golpee la placa firmemente sobre papel absorbente después del último paso de lavado.

8. Dispensar 100 µl de sustrato en cada pozo.

9. Incubar durante  $15 \pm 3$  minutos en la temperatura de la habitación.

10. Dispensar 100 µl de solución de parada en cada pocillo.

11. Lea los resultados a 450 nm en un lector de microplacas.

## Validación de pruebas

---

- La DO media de los controles negativos debe ser inferior a 0.200 DO.
- La DO media de los controles positivos debe ser superior a 0.800 DO.

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

## Resultados e Interpretación

---

### Cálculo de la relación muestra/positivo

$$\text{Relación S/P} = \frac{\text{DO de Muestra} - \text{DO CN}}{\text{DO CP} - \text{DO CN}} \times 100$$

donde:

MUESTRA DE OD = Valor DO de una muestra

DO CN = Valor medio de DO del control negativo

DO CP = Valor medio de DO del control positivo

## Interpretación

Los resultados se indican de acuerdo con las siguientes tablas:

### Suero individual, muestras de plasma y muestras individuales de leche

Negativo	Positivo
$\leq 25$	$> 25$

### Muestras de suero agrupadas

Negativo	Positivo
$< 5$	$\geq 5$

En este punto de corte, se espera una tasa de falsos positivos inferior al 0,5%. Para campañas más agresivas, se recomienda un corte más bajo con una tasa esperada de falsos positivos de menos del 1%. Llámenos para consulta.

*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)



