

# BRUCELLA LPS iELISA Bulk Milk

## BRUCELLA S KIT DE PRUEBA DE ANTICUERPOS, LPS iELISA LECHE EN TANQUE

El BRUCELLA S ANTIBODY TEST KIT, LPS iELISA Bulk Milk es una prueba semicuantitativa que utiliza tecnología ELISA indirecta. La prueba determina la presencia y el título de anticuerpos contra las especies de *Brucella* que producen cepas lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, y *B. suis* - Rev. Sci. Tech., OIE 1982) en muestras de leche individual o en tanque procedentes del ganado. La presencia de anticuerpos indica una infección reciente o actual con Biovares de *Brucella* lisos.

Siga las pautas de su país para determinar cuántas muestras de leche de tanque se pueden analizar.

La prueba diagnóstica utiliza placas de microtitulación que contienen pocillos recubiertos con lipo-polisacárido (LPS) extraído 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 secundarios conjugados con HRP (conjugado) 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 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 la muestra de leche animal.

# 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 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 formulación 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 con 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 formulación patentada que contiene albúmina sérica animal. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
<b>Placa recubierta <i>Brucella</i> LPS</b>	2 placas	5 placas
<p><i>Brucella abortus</i> LPS recubierto de microplacas. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
<b>Solución de parada</b>	30 ml	70 ml
<p>Listo para usar; solución ácida de baja concentración.</p>		

---

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).

---

**ClearMilk™Buffer**

**20 ml**

**40 ml**

---

Listo para usar; fórmula patentada

Contiene 0.095% de azida de sodio como conservante.

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

---

## Materiales requeridos pero no proporcionados

---

- Micropipetas y puntas de dosificación simple y múltiple de precisión para volúmenes entre 10 y 1000 µl (*por ejemplo*, pipetas individuales 10-100 y 100-1000 µl y pipetas multicanal 5-50 y 50-300 µl)
- Tubos de ensayo o placa(s) de transferencia no recubiertas de antígeno para diluir muestras
- Botellas de plástico o vidrio con taparrosca y, vasos de precipitados de laboratorio o matraces Erlenmeyer para hacer Buffer de lavado listos para usar
- 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 mezclador 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 de TMB con cristal 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.
- La azida de sodio es una sustancia tóxica y se usa en algunos reactivos. En caso de contacto con los ojos o la piel, enjuague inmediatamente con grandes cantidades 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 cantidad de agua para ayudar a prevenir la acumulación de azida.
- La solución de parada contiene ácido diluido. Usar 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 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 Brucella LPS iELISA Bulk Milk de Ellie se puede realizar con muestras de leche individuales y de tanque de ganado.

### Muestras de leche

La prueba utiliza 200 µl de suero lácteo 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. Se deben recolectar muestras de leche individuales antes del proceso de ordeño. Recolecte 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.

Retire la placa recubierta de antígeno de la bolsa de aluminio. Si usa placas parciales, solo retire el número de pozos necesarios para analizar todas las muestras. Coloque los pozos restantes de nuevo en la bolsa y devuélvalos a 2-8°C.

## *Preparación del Buffer de lavado*

Prepare buffer de lavado listo para usar mezclando un buffer de lavado 10X de una parte 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 en la temperatura ambiente hasta un mes.

## *Preparación conjugado*

Diluya el conjugado 100X concentrado 1:100 con diluyente conjugado combinando una parte del conjugado 100X con 99 partes del diluyente conjugado (*por ejemplo*, la cantidad necesaria para una placa es preparado por mezcla 110 µl de conjugado concentrado y 10,89 ml de diluyente 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 Muestras y Controles*

Prepare muestras de leche tratándolas con ClearMilk™ Buffer de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Mezcle cada muestra de leche antes del procesamiento.
2. Pipetear 1 ml de leche en 1,5 ml de microtubo eppendorf.
3. Añadir 60 microlitros de ClearMilk™ Buffer y mezclar suavemente.
4. Incubar 5-30 minutos hasta que la leche se coagule o se agrupe.
5. Centrifugar en microcentrifuga a 10-15 000 RPM durante 5 minutos.

6. El suero de leche se separará como una capa media. Use suero de leche para pruebas adicionales.

Controles prediluidos 1:100 en diluyente de muestra (*por ejemplo*, 10 µl de controles o muestras en 990 µl de diluyente de muestra). Utilice placas de transferencia o microtubos. Mezclar bien antes de seguir procesando. Para microplacas, use un agitador de placas; para los tubos, use un mezclador de vortex, si está disponible.

## Procedimiento de prueba

---

1. Cargue los controles y muestras en una placa recubierta Brucella LPS.
  - Pipetee 100 µl de diluyente de muestra en todos los pozos de prueba de placa recubierta de Brucella LPS. Agregue inmediatamente 100 µl de controles prediluidos y 100 µl de muestras de suero lácteo en sus respectivos pocillos.  
Pipeteé controles por duplicado para cada placa.

### NOTAS:

- Si hay un gran número de muestras a analizar, transfiera las muestras a una placa de transferencia primero y luego transfiera 100 µl de cada muestra a un pozo correspondiente en una placa recubierta de LPS de Brucella. Utilice una pipeta multicanal para pipetear las muestras en los pocillos de prueba de la placa recubierta de LPS de Brucella.
2. Mezcle bien la placa de prueba antes de continuar con el procesamiento. Use un agitador de placas si está disponible.
  3. Cubra la placa e incube:
    - Protocolo corto para leche individual y de tanque: 60 minutos a temperatura ambiente.
    - Protocolo nocturno (mayor sensibilidad) para leche de tanque: 14-28 horas a 2-8°C.
  4. Lavar la placa:
    - Deseche el contenido de la placa.
    - Lavar cuatro veces con 300 ± 20 µl de Buffer de lavado.
    - Golpee la placa firmemente sobre papel absorbente después del último paso de lavado.
  5. Dispensar 100 µl de conjugado en cada pozo.
  6. Cubra la placa e incube durante 30-40 minutos a temperatura ambiente.
  7. Lavar el plato:
    - Deseche el contenido de la placa.
    - Lavar cuatro veces con 300 ± 20 µl 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 ± 3 minutos a temperatura ambiente.
  10. Dispensar 100 µl de Solución de parada en cada pozo.

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*

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

donde:

Muestra DO = 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 interpretan de acuerdo con las siguientes tablas:

### **Protocolo corto**

#### **Muestras individuales de leche**

<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
< 40	≥ 40

#### **Muestras de leche de tanque**

<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
< 20	≥ 20

### **Protocolo nocturno**

#### **Muestras de leche de tanque**

<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
< 20	≥ 20

***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)