

Orgullosamente desarrollado en colaboración con un instituto de investigación del ministerio de agricultura de Brasil, Embrapa Campo Grande.



TB Chimera iELISA (Embrapa Kit)

KIT DE PRUEBA DE ANTICUERPOS MYCOBACTERIUM BOVIS, iELISA

EL MYCOBACTERIUM BOVIS ANTIBODY iELISA TEST KIT es una prueba cualitativa que utiliza la tecnología ELISA indirecta. La prueba está diseñada para determinar la presencia de anticuerpos contra secuencias peptídicas específicas de las proteínas *Mycobacterium bovis* MPB70, MPB83 y ESAT-6 en muestras individuales de suero bovino. La presencia de estos anticuerpos específicos indica la exposición a *M. bovis*.

Las secuencias peptídicas se fusionan en una proteína quimérica y se expresan juntas en un sistema recombinante estándar de *Escherichia coli* (cBTB).

La prueba diagnóstica utiliza placas de microtitulación que tienen pozos recubiertos con cBTB. Cualquier anticuerpo presente en la muestra se unirá al cBTB recubierto en la placa. Después de un paso de lavado posterior, los anticuerpos conjugados con peroxidasa secundaria (conjugado) se unirán a cualquier anticuerpo inmovilizado en los pozos. Después de otro paso de lavado, cualquier conjugado unido se revela utilizando un sustrato TMB, que produce color en presencia de peroxidasa. Un lector de microplacas mide la densidad óptica del color producido. La cantidad de color generado es proporcional a la cantidad específica de anticuerpos anti-*M. bovis* en el suero animal.

Contenido del kit

Reactivos	Kit de 2 placas	Kit de 5 placas
Control positivo	0.5 ml	1 ml
<p>Listo para usar; suero bovino positivo contra <i>Mycobacterium bovis</i>. Contiene 0.095% de azida de sodio como conservante. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
Control negativo	0.5 ml	1 ml
<p>Listo para usar; suero bovino negativo contra <i>Mycobacterium bovis</i>. Contiene 0.095% de azida de sodio como conservante. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
Diluyente de muestra	60 ml	120 ml
<p>Listo para usar; La fórmula patentada contiene 0.1% ProClin 300 como conservante. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
Conjugado 100X	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>		
Sustrato	30 ml	70 ml
<p>Listo para usar; Solución tamponada TMB. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
Buffer de lavado 10X	100 ml	2 x 100 ml
<p>Fórmula patentada que contiene 0.1% ProClin 300. Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
Diluyente conjugado	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>		
Placa recubierta de cBTB	2 placas	5 placas
<p>Las secuencias peptídicas de las proteínas MPB70, MPB83 y ESAT-6 se fusionan en una proteína quimérica y expresada en conjunto en un sistema recombinante estándar de <i>Escherichia coli</i> (cBTB). Código de peligro: No clasificado según la normativa de la UE.</p>		
Solución de parada	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 no se encuentra bien, 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 µl (*por ejemplo*, pipetas individuales 10-100 y 100-1000 µl y pipeta multicanal 5-50 y 20-200 µl)
- Tubos de ensayo o placa(s) de transferencia sin recubrimiento de antígeno con fondo plano o en U para diluir muestras
- Botellas de plástico o vidrio con taparrosca, vasos de precipitados de laboratorio o matraces erlenmeyer para hacer Buffer de Lavado listo para usar
- Depósitos de reactivos para transferir reactivos a placas
- Lector de microplacas ELISA o espectrofotómetro equipado con filtro de 450 nm
- Agua purificada por desionización, destilada o RO 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 de vórtice

Para obtener suministros, póngase en contacto con nuestro servicio de atención al cliente en 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 series de kits. No exponga la solución de TMB a la luz fuerte ni a ningún agente oxidante. Manipule la solución de TMB con cristal limpio o plástico.

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

Requisitos de la muestra

La prueba de TB quimera iELISA de Ellie (Embrapa Kit) se puede realizar con muestras de suero del ganado.

La prueba utiliza solo 10 µl de suero por prueba única. Recolectar la cantidad de sangre requerida por el sistema de recolección de sangre. Recolectar sangre asépticamente en tubos no tratados o tubos separadores de suero. Permita que la sangre coagule y separe el suero. Evite el uso de sueros muy hemolizados o contaminados. Conservar los sueros a 2-8°C. Congele los sueros a -20 ° C si no se procesan dentro de las 72 horas; evite la congelación repetida.

Pasos preliminares

Preparación de reactivos

Todos los reactivos del kit deben equilibrarse a temperatura ambiente (20-25 ° C) antes de su uso.

Tome la placa recubierta de péptidos 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 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 una placa 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 diluyente conjugado combinando una parte conjugado 100X con 99 partes diluyente conjugado (*por ejemplo*, la cantidad necesaria para una placa se prepara mezclando 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

Mezcle bien las muestras antes de la prueba.

Pre-diluir controles y muestras de suero 1:20 en diluyente de muestra (*por ejemplo*, 10 µl de controles o muestras en 190 µl de diluyente muestral). Pipetee controles por duplicado. 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 vortex, si está disponible.

Procedimiento de Prueba

1. Transfiera 100 µl de muestras y controles prediluidos a todos los pozos de prueba de placa recubierta de cBTB. Pipetee controles por duplicado.
2. Cubra la placa e incube durante 60 minutos a 36-38 °C.
3. 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.
4. Dispensar 100 µl de Conjugado en cada pozo.
5. Cubra la placa e incube durante 60 minutos a 36-38 °C.
6. 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.
7. Dispensar 100 µl de sustrato en cada pozo.
8. Incubar durante 15 ± 3 minutos al temperatura ambiente.
9. Dispensar 100 µl de Solución de Parada en cada pozo.
10. Lea los resultados a 450 nm en un lector de microplacas.

Validación de pruebas

- La DO media 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.

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 /negativa (S/N)

Relación S/N = DO Muestra/ DO CN

donde:

DO Muestra = Valor DO de una muestra

DO CN = Valor medio de DO del control negativo

Interpretación

La interpretación de los resultados de un ensayo de anticuerpos para la tuberculosis debe basarse en una combinación de la información epidemiológica del animal y el rebaño, combinada con el nivel de anticuerpos detectado. Clasificar a un animal positivo también depende de la definición de un "positivo". Por ejemplo, un animal positivo se puede definir como cualquier animal que es positivo en el cultivo de tejidos, o cualquier animal con lesiones encontradas en el sacrificio. El punto de corte será diferente en función de la definición seleccionada. Para ser equivalente a animales positivos en cultivo de tejidos, el corte de TB iELISA Chimera (Embrapa Kit) sería 4. Para ser equivalente a los animales encontrados con lesiones, el punto de corte sería 8.

La información epidemiológica adicional podría incluir cómo se alojan los animales, confinados versus en libertad. Los animales en libertad tienen menos probabilidades de tener alguna reacción en la prueba.

ellie

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