

BRUCELLA cELISA

KIT cELISA, ANTICUERPO ANTI BRUCELLA S

El Brucella cELISA es un ensayo cualitativo que utiliza la tecnología de ELISA competitiva. El ensayo está diseñado para determinar la presencia de anticuerpos contra especies de Brucella, las cuales producen colonias lisas, en muestras individuales de suero y plasma (*Brucella melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* – Rev. sci. Tech., OIE 1982). La presencia de anticuerpos indica una infección previa con una cepa de colonia lisa de Brucella. El uso recomendado de este producto es para pruebas de monitoreo o confirmatorias.

Brucella cELISA ha sido validado para muestras de suero y plasma de ganado bovino, ovino y caprino.

La prueba diagnóstica utiliza placas de microtitulación que tienen pocillos recubiertos con lipopolisacárido (LPS) extraídos de la bacteria *Brucella abortus*. Cualquier anticuerpo anti-Brucella presente en la muestra competirá con el LPS específico, el anticuerpo monoclonal de ratón se unirá al sitio específico del LPS. En caso de presencia de anticuerpos de Brucella en las muestras probadas, los anticuerpos anti-Brucella de ratón serán bloqueados de su unión. Después de un paso de lavado subsecuente, se añade un anticuerpo monoclonal secundario anti-Brucella de ratón específico para lipopolisacárido (LPS). Seguido de otro paso de lavado, cualquier Conjugado unido es revelado utilizando un substrato TMB, el cual 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 inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos anti-Brucella en el suero animal.

Componentes del Kit

Reactivos	2-placas	5-placas
Control Positivo	2 ml	4 ml
<p>Listo para usar. Suero Bovino control positivo; Contiene 0,095% de azida sódica como preservante; Clasificación de riesgo: No está clasificado de acuerdo con la regulación de EU.</p>		
Control Negativo	2 ml	4 ml
<p>Listo para usar. Suero bovino negativo a <i>Brucella spp.</i> Contiene 0.095% de azida sódica como preservante; Clasificación de riesgo: No está clasificado de acuerdo con la regulación de EU.</p>		
Diluyente de Anticuerpo Concentrado 20X	30 ml	50 ml
<p>Listo para usar. Fórmula de propiedad del fabricante. Clasificación de riesgo: No está clasificado de acuerdo con la regulación de EU.</p>		
Conjugado 100X	0.5 ml	1 ml
<p>Fórmula de propiedad del fabricante. Contiene anticuerpos animales purificados. Clasificación de riesgo: No está clasificado de acuerdo con la regulación de EU.</p>		
Anticuerpo Concentrado 20X	0.7 ml	1.7 ml
<p>Fórmula de propiedad del fabricante. Contiene anticuerpos animales purificados. Clasificación de riesgo: No está clasificado de acuerdo con la regulación de EU.</p>		
Substrato	30 ml	70 ml
<p>Listo para usar; Solución buffer TMB. Clasificación de riesgo: No está clasificado de acuerdo con la regulación de EU.</p>		
Solución de Lavado 10X	100 ml	2 x 100 ml
<p>Fórmula de propiedad del fabricante, 10X Tris buffer concentrado con EDTA y cloruro de sodio. Clasificación de riesgo: No está clasificado de acuerdo a la regulación de EU.</p>		
Diluyente de Conjugado	30 ml	70 ml
<p>Fórmula de propiedad del fabricante, contiene albúmina animal; Clasificación de riesgo: No está clasificado de acuerdo con la regulación de EU.</p>		
Solución de Parada	30 ml	70 ml
<p>Listo para usar; solución ácida de baja concentración. Clasificación de riesgo: R35 - Causa quemaduras severa; S26: En caso de contacto con los ojos, lave inmediatamente con suficiente agua y busque atención médica; S36/37/39: Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para de ojos/cara; S45: En caso de accidente o presentar alguna reacción, busque atención médica (muestre la etiqueta del recipiente).</p>		
Placas recubiertas con LPS de <i>Brucella abortus</i>	2 placas	5 placas
<p>Microplacas recubiertas con LPS de <i>Brucella abortus</i>; Clasificación de riesgo: No está clasificado de acuerdo con la regulación de EU.</p>		

Materiales requeridos, pero no provistos

- Micropipeta Monocanal y multicanal, así como puntas para volúmenes entre 10-1000 μl (ej. pipetas Unicanal 10-100 and 100-1000 μl y pipetas multicanal de 50-300 μl)
- Tubos para pruebas o placas inertes para la dilución de muestras
- Botellas plásticas o de vidrio con tapa rosca, vasos de precipitado o Erlenmeyer para la preparación
- Canaletas para la transferencia de reactivos a las placas
- Lector de microplacas de ELISA o espectrofotómetros equipado con filtro de 450 nm
- Agua desionizada, destilada o agua purificada para preparar solución de lavado
- Equipo lavador de microplacas manual o automático
- Incubadora capaz de alcanzar una temperatura de $+37^{\circ}\text{C}$
- Tapas o adhesivos para cubrir las microplacas
- Agitador de microplacas y Vórtex

Realice sus solicitudes contactando a servicio al cliente al correo support@ellielab.com.

Almacenamiento y estabilidad

Almacenar el Anticuerpo Concentrado 20X y el Conjugado 100X en congelación a $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$. Todos los otros reactivos deben ser almacenados a $2-8^{\circ}\text{C}$.

No equilibre el Anticuerpo Concentrado 20X y el Conjugado 100X a temperatura ambiente para su uso. Utilice directamente desde el congelador para hacer los componentes listos para usar. Regrese a congelación después de su uso. Todos los otros reactivos del kit deben alcanzar temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) antes de ser usados. Permita que los reactivos alcancen esta temperatura ($20-25^{\circ}\text{C}$) durante por los menos 90 minutos hasta 2 horas.

El kit es transportado en una caja refrigerada a temperatura entre 0 y 15°C . Los resultados recibidos durante el estudio de rendimiento y estabilidad muestran que la temperatura de almacenamiento del kit completo a $2-8^{\circ}\text{C}$ no afecta el rendimiento del kit durante los primeros 15 días.

No utilice los componentes después de la fecha de expiración. No mezcle los reactivos de diferentes lotes. No exponga la solución de TMB a la luz fuerte o cualquier agente oxidante. Maneje la solución de TMB en vasos limpios o material plástico.

Se debe tener cuidado para prevenir la contaminación de los componentes.

Advertencias

- Todos los reactivos son para uso *in vitro* únicamente.
- No pipetee con la boca.
- Evite el contacto con la piel lacerada.
- La Azida sódica es una sustancia tóxica y es utilizada en algunos reactivos. En caso de contacto con los ojos y la piel, lave inmediatamente con abundante agua. La Azida puede reaccionar con el plomo de cobre de la plomería formando azidas metálicos explosivos. Durante la disposición

de los reactivos, enjuague con gran cantidad de agua para ayudar a prevenir la formación de azida.

- La Solución de Parada contiene una dilución de solución ácida. Úsela con cuidado para evitar contacto con la piel y los ojos. Evite la exposición a bases, metales u otros componentes que puedan reaccionar con ácidos. Los derrames deben ser limpiados inmediatamente.

Todos los materiales en este kit deben ser tratados de acuerdo con la hoja de seguridad del producto.

Muestras requeridas

La prueba de Brucella cELISA de Ellie's puede ser realizada con muestras de suero y plasma de bovinos, ovinos y caprinos.

La prueba requiere únicamente 60 ul de muestra por duplicado. Recolectar la cantidad de sangre requeridas con un Sistema de recolección de sangre.

Recolectar la sangre asépticamente en tubos sin tratar o en tubos para separar suero. Permita que la sangre se coagule y separe el suero. Evite el uso de sueros hemolizados o contaminados. Almacene el suero a 2-8°C. Congele el suero a -20°C si no se usa en las siguientes 72 horas luego de colectado. Evite repetir el congelado.

Pasos Preliminares

Preparación de reactivos

Todos los reactivos del kit deben alcanzar temperatura ambiente (20-25°C) antes de ser usados, **con excepción del Conjugado 100X y Anticuerpo Concentrado 20X**. Permita que los reactivos alcancen esta temperatura durante por lo menos 90 minutos hasta 2 horas.

Si se utiliza únicamente parte de la placa recubierta, solo se debe sacar de la bolsa de aluminio, los pozos necesarios para la realización de las pruebas. Coloque los pozos sobrantes en la bolsa de aluminio y almacene a 2-8°C.

Cuando el kit se equilibra a temperatura ambiente, prepare los siguientes reactivos para la prueba:

Preparación del Solución de Lavado

Prepare la cantidad necesaria de Solución de Lavado lista para usar después de 90 minutos hasta 2 horas de equilibrio del kit, antes de comenzar con la prueba.

El Solución de Lavado está listo para ser usado, mezclando una parte del Solución de Lavado concentrado 10X con 9 partes de agua destilada o desionizada. Es muy importante equilibrar la Solución de Lavado a temperatura ambiente antes de su uso. Mezcle bien. 300 ml de Solución de Lavado (30 ml Solución de Lavado + 270 ml agua desionizada, destilada o agua purificada) es suficiente para una secuencia de lavado de una placa. Mantenga la Solución de Lavado hasta por un mes a temperatura ambiente.

Preparación del Anticuerpo de Competencia

Prepare la cantidad necesaria de Anticuerpo competitivo lista para usar 5-15 minutos antes de comenzar con la prueba.

Use el Anticuerpo Concentrado 20X directamente del congelador para preparar una solución lista para usar. Mezcle el Anticuerpo Concentrado 20X suavemente en vórtex antes de preparar la solución de uso. Prepare la dilución en tubos de centrifuga de polipropileno o HDPE. Diluya 1:20 en Diluyente de Anticuerpo Concentrado 20X, mezclando una parte de **Anticuerpo Concentrado 20X** con 19 partes del Diluyente de Anticuerpo Concentrado 20X. La cantidad necesaria para una placa se prepara mezclando 300 µl de **Anticuerpo Concentrado 20X** y 5.7 ml de Diluyente de Anticuerpo Concentrado 20X. **Regrese el Anticuerpo Concentrado 20X a congelación después de su uso.** ¡La dilución preparada se debe usar dentro de una hora después de la preparación!

Preparación del Conjugado

Use el 100X Conjugado directamente del congelador para preparar una solución lista para usar. Mezcle el conjugado 100X concentrado brevemente en vórtex antes de preparar la solución de uso.

Prepare la dilución en tubos de centrifuga de polipropileno o HDPE. Diluya 1:100 el Conjugado 100X en Diluyente de Conjugado, mezclando una parte del Conjugado 100X con 99 partes del diluyente. La cantidad necesaria para una placa se prepara mezclando 110 µl del Conjugado concentrado y 10.89 ml del Diluyente de Conjugado. **Regrese el Conjugado 100X a congelación después de su uso.** ¡Proteja la dilución preparada de la luz (Envuelva el tubo que contiene la dilución preparada en papel de aluminio)! ¡La solución preparada se debe usar dentro de una hora después de la preparación!

Preparación de Muestras y controles

Prediluir los controles y las muestras en una proporción de 1:1 con Anticuerpo (p. Ej., 60 µl de controles o muestras con 60 µl de Anticuerpo). Los controles se pipetea por duplicado. Utilice placas de transferencia o microtubos. Mezclar bien antes de seguir procesando. Para microplacas, use un agitador de placas; para tubos, use un mezclador vórtex, si está disponible.

Procedimiento de la prueba

1. Prepare la cantidad necesaria de Solución de Lavado lista para usar después de 90 minutos hasta 2 horas de equilibrio del kit, antes de comenzar con la prueba. Ver ítem Preparación del Solución de Lavado.
2. Prepare la cantidad necesaria de Anticuerpo de Competencia lista para usar 5-15 minutos antes de comenzar con la prueba. Ver ítem Preparación del Anticuerpo de Competencia.
3. Dispensar 60 μ l de cada muestra en los pozos de la placa de dilución. Dispense 60 μ l del Control Positivo y Control Negativo por duplicado.
4. Dispensar 60 μ l de Anticuerpo de Competencia a cada pocillo de la placa de dilución. Mezcle con agitación orbital suave durante 1 minuto.
5. Dispensar 100 μ l de dilución de Anticuerpo de Competencia y de muestras a cada pocillo de la placa recubierta con Brucella LPS.
6. Cubra la placa con tapa adhesiva e incubar una hora a 37°C o toda la noche (18 a 26 horas) a temperatura ambiente (20-25 °C).
7. Prepare la cantidad necesaria de Conjugado lista para usar 5-15 minutos antes de finalizar el tiempo de incubación a 37°C. Ver ítem Preparación del Conjugado.
8. Lave la placa:
 - Retire la tapa o adhesivo de la placa.
 - Elimine el contenido de la placa
 - Lave cuatro veces con 300 \pm 20 μ l de Solución de lavado.
 - Retirar el líquido completamente después del último paso de lavado por volcado y golpeando la placa sobre material absorbente.
9. Dispensar 100 μ l de Conjugado a cada pocillo. Mezcle con agitación orbital suave durante 3-5 segundos.
10. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente. No cubra la placa.
11. Lave la placa:
 - Elimine el contenido de la placa.
 - Lave cuatro veces con 300 \pm 20 μ l de Solución de lavado.
 - Retirar el líquido completamente después del último paso de lavado por volcado y golpeando la placa sobre material absorbente.
12. Dispensar 100 μ l de Substrato a cada pocillo. Mezcle con agitación orbital suave durante 3-5 segundos.
13. Incubar 15 \pm 3 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).
14. Dispensar 100 μ l de Solución de Parada a cada pocillo.
15. Medir la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas. Realizar la lectura dentro de los 10 minutos después de haber agregado la Solución de Parada.

Validación de la Prueba

- El promedio OD de los Controles Negativos debe ser >0.800 .
- El promedio OD de los Controles Positivos debe ser <0.400 .

Si no se cumplen los criterios de validación, los resultados de la prueba serán inválidos y se debe repetir las pruebas.

Resultados e Interpretación

Calcular el porcentaje de inhibición (PI)

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición (PI) con respecto al control Negativo incluido en cada ensayo. Los valores absorbancia medios a 450 nm de cada muestra (DO muestra) y del Control Negativo (CN)

Se relacionan de la siguiente forma:

$$PI = 100 - \frac{DO \text{ Muestra} \times 100}{DO \text{ CN}}$$

donde:

DO Muestra = Valor de DO de la muestra

DO CN = Media del valor de DO del Control Negativo

Interpretación

Los resultados son interpretados de acuerdo con la siguiente tabla:

Los valores de los Puntos de Corte para países de la UE y animales no vacunados:

Negativo	Positivo
≤ 35	> 35

Los valores de los Puntos de Corte para el resto del mundo y animales vacunados:

Negativo	Positivo
≤ 50	> 50

En el caso de muestras Positivas deben ser repetidos los análisis en duplicado. Si cualquiera de los duplicados muestra un resultado positivo, la muestra es considerada positiva.

Los valores de los Puntos de Corte pueden variar de país a país, por diferentes usos o estado de vacunación de los animales.

Referencias

EU Council Directive 64/432/EEC, 2008.

ellie

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