

INMUNOLOGÍA Y GENÉTICA APLICADA, S.A.



INGEZIM Brucella Bovina Milk

Prod Ref: 12.BB.K1

Ensayo inmunoenzimático indirecto para la detección de anticuerpos específicos frente a *Brucella* en leche o lactosuero de ganado bovino (individual y en mezcla).

Immunoenzymatic assay to detect antibodies specific of Brucella in milk or whey samples (individual or pools) of cattle

Última revisión / Last revision: 10-12-15
Registrado por el MAGRAMA nº 1129 RD

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	6 Placas 6 Plates	
	Unid	Vol
Placas de microtitulación de 96 pocillos. 96 well microtitration plates.	6	-
Viales conteniendo leche Control Positivo para Brucella Vials containig Positive Control milk for Brucella	1 vial	2 ml
Viales conteniendo leche Control Negativo para Brucella Vials containing Negative Control milk for Brucella	1 vial	2 ml
Viales conteniendo Conjugado Especifico (100x). Vials containing Conjugate specific (100x)	1 vial	700 µl
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1 frasco	125 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE10-01) Bottles containing diluent (DE10-01)	1 frasco	250 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso. Bottles containig substrate (TMB) ready to use	1 frasco	75 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. Bottles containing stoping solution	1 frasco	120 ml

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT
OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT:

Agua destilada o desionizada
Micropipetas de 5 a 200 µl.
Puntas de micropipeta de un solo uso
Dispositivos para lavado de placas.
Probetas de 50-250ml
Lector ELISA (filtro de 450 nm)

Distilled or deionised water.
Micropipettes from 5 to 200 µl.
Disposable micropipette tips.
Washing plates device.
Test tubes from 50 to 250 ml
ELISA Reader (450 nm filter)

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Las especies de *B.abortus* y *B.melitensis*, poseen 2 componentes principales a nivel antigénico. Uno de ellos, el LPS-S, es un complejo proteína-lipopolisacárido con actividad endotóxica responsable de la especificidad para aglutinógenos de superficie lisa y principal componente antigénico de las especies de *Brucella*. El otro, poli-B, es un polisacárido que carece de actividad endotóxica y no juega un papel muy importante en test de aglutinación.

Nuestro kit está diseñado para la detección de anticuerpos específicos del LPS y se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático indirecto, que se describe brevemente a continuación.

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) se fija el preparado antigénico del agente causal. En este caso se trata de un extracto del LPS de *Brucella abortus* purificado.

Cuando sobre la placa se dispensan las muestras problema, en el caso de contener anticuerpos específicos frente a *Brucella*, estos quedarán adheridos al antígeno fijado a la placa. Tras sucesivos lavados con los que se consigue la eliminación del material no adherido, puede revelarse la presencia de inmunoglobulinas bovinas mediante un conjugado específico (anticuerpo monoclonal anti-IgG bovina marcado con peroxidasa) que al reaccionar con el sustrato adecuado producirá una reacción colorimétrica.

II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
6. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al bote.
11. La solución de frenado es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2°C y +8°C).

IV. INFORMACION SOBRE EL MODO DE REALIZAR LOS LAVADOS

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300 µl por pocillo. Tras las incubaciones, realizar los lavados según las siguientes instrucciones:

- Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.
- Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

V. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Muestras de leche o lactosuero (individuales o en mezclas de hasta 200 muestras) Se añaden sin diluir previamente. Pueden utilizarse frescas, refrigeradas o previamente congeladas. Las muestras de leche deben ser centrifugadas previamente durante 15 min a 2000xg para eliminar la capa lipídica, o esperar a que la capa lipídica se forme en la superficie. Se deberá recoger muestra por debajo de esa capa de lípidos.

Para la obtención de lactosuero, congelar / descongelar la muestra.

VI. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- **Preparación de conjugado:**

(Preparar inmediatamente antes de su uso)
Hacer una dilución 1/100 en diluyente. Se recomienda diluir únicamente el volumen que vaya a ser utilizado ya que la solución sobrante ha de ser desechada:
(110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente es suficiente para una placa; 10µl de conjugado en 1 ml de diluyente es suficiente para una tira de 8 pocillos)

- **Solución de lavado:**

Diluir un parte de solución concentrada con 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua destilada). Una vez preparada la solución, permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

- **Preparación de los controles (+) y (-) de leche**

No necesitan preparación alguna. Añadir 100µl/pocillo sin diluir previamente.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente
No hace falta preparación ni dilución alguna de la muestra. Añadir 100 µl de la muestra directamente al pocillo. Añadir igualmente 100 µl de los controles positivo y negativo de leche.
Mantener 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Lavar 4 veces según procedimiento anterior.
3. Añadir 100 µl del Conjugado, preparado según instrucciones anteriores, a cada pocillo. Tapar la placa e incubar a **30 min. a temperatura ambiente.**
4. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
5. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Mantener la reacción durante **5 minutos** a temperatura ambiente y en oscuridad.
6. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo en el mismo orden en que se dispuso el sustrato.
7. Leer los valores de absorbancia a 450nm en los 5 min. Siguiendo a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

La lectura se realiza a una longitud de onda de 450 nm.

A. VALIDACION DE RESULTADOS:

1. La Abs 450 nm del C (-) $\leq 0,2$
2. La Abs 450 nm del C (+) $\geq 0,8$

B. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Los puntos de corte positivo y negativo se calculan de la siguiente manera:

$Cut\ Off\ (-) = Abs\ 450nm\ C.Pos \times 0,35 = 35\% \text{ Positividad}$
 $Cut\ Off\ (+) = Abs\ 450nm\ C.Pos + x\ 0,4 = 40\% \text{ Positividad}$

Cuando se analicen muestras por duplicado, deberá utilizarse la media de los valores de DO obtenidos para todos los cálculos.

Las muestras con absorbancias mayores al cut off (+), se consideran positivas mientras que las muestras con absorbancias menores al cut off (-), serán negativas.

Las muestras con valores entre ambos cut off (entre 35 y 40% de positividad) se consideran dudosas y se recomienda testar una nueva muestra transcurridas unas semanas o la aplicación de otras técnicas como la fijación de complemento.

I. TECHNICAL BASIS

Brucella species have two main antigenic components. One of those is a protein-polysaccharide complex LPS-S with endotoxic activity, responsible of the specificity of agglutination and is the major antigenic component. The second one is a polysaccharide (poli-B) with no endotoxic activity and with no relevance role in the agglutination test.

The INGEZIM BRUCELLA kit is based on the indirect immunoenzymatic assay described below:

The antigen is fixed in a solid support (polystyrene plate). The antigen used is a purified extract of the

LPS of Brucella. The serum sample is added to each well. After incubation and washing we add a labelled monoclonal antibody (peroxidase conjugated) specific to bovine immunoglobulins. If the serum sample contains antibodies against the Brucella, the conjugate will bind to the plate, whereas if it does not contain specific antibodies no binding of the conjugate will be appreciated. After washing the plate to eliminate all non-fixed material, we can detect the presence or absence of labelled conjugate by adding the substrate that in presence of the peroxidase will develop a colorimetric reaction.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits.
4. Avoid any contamination of the reagents of the Kit.
5. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use an new tip for each serum sample.
9. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
10. For each utilisation of the Kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
11. Substrate must be handle with care, it is very sensible to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored between +2°C y +8°C.

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

The washing steps could be done using an automatic washing machine or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl on each well.

After the incubation periods, the washing steps must be done following the next instructions:

- Throw out the content of the plate by a brusque turn over of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µl of washing solution on each well.
- Shake delicately the plate, avoiding the contamination between wells.
- Turn over the plate brusquely to empty the wells.
- Repeat the process as much times as is indicated on the instructions of the Kit.
- Prior to empty the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not maintain the plate on dry more time than strictly needed.
- After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.

INGEZIM BRUCELLA BOVINA MILK 12.BB.K1

V. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionized water (40 ml of the concentrated solution in 960 ml of distilled or deionized water). Once ready, this solution remains stable between +2°C y +8°C.

- **Preparation of the conjugate (to make immediately before use):**

Dilute the needed quantity of conjugate provided in the Kit 1/100 with diluent:

- ❖ The necessary and sufficient quantity of conjugate for a complete plate is 110 µl of Conjugate in 11 ml of diluent.

- ❖ The necessary and sufficient quantity of Conjugate for an eight wells strip is 10 µl of conjugate in 1 ml of diluent.

Shake very well the solution before use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

- **Control milk:**

They are ready to use. Do not dilute.

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

Milk or whey samples (both, individual or pools up to 200 milk samples). Must be tested undiluted. Fresh, refrigerated or previously frozen milk may be tested. Milk samples must be centrifuged for 15 minutes at 2000 x g to remove the lipid layer, or leave the milk samples until the fat layer is formed on top of the sample. Pipette under the fat layer. To obtain whey, freeze/thaw milk samples.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 100 µl of milk samples and controls without dilution. We recommend running samples and control in duplicate for screening purposes. Incubate the plate for **1 hour at room temperature (20-25°C)**.
3. Wash 4 times following the described procedure.
4. Add 100 µl of conjugate (prepared following previous instructions) to each well. Incubate the plate for **30 minutes at room temperature (20-25°C)**.
5. Wash 5 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate in darkness for **5 min** at room temperature.
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Read the OD of each well with a spectrophotometer at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with a spectrophotometer at **450 nm**.

A. VALIDATION OF THE TEST

Test is considered valid when:

1. OD value of the positive control milk is ≥ 0.8
2. OD of the negative control milk is ≤ 0.2

B. INTERPRETATION OF THE RESULTS:

Positive and negative cut offs are calculated as follows:

Cut off (+) = OD of positive control x 0.4 = 40% positivity

Cut off (-) = OD of positive control x 0.35 = 35% positivity

When you are running duplicate samples, OD values will be calculated for each sample as the arithmetic mean of both values

- ⇒ All samples with OD higher than the CUT OFF (+) value must be considered as positive.
- ⇒ All samples with OD values lower than the CUT OFF (-) values will be considered as negative
- ⇒ Samples with OD values between these two cut off should be considered doubtful.



Producto desarrollado y producido por:
Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
C/ Hnos. García Noblejas, 39
28037- MADRID (SPAIN)
Tlf: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es

