



# INGEZIM BRUCELLA SMALL RUMINANTS

Prod Ref: 13.BM.K1

Ensayo inmunoenzimático indirecto para la detección de anticuerpos específicos frente a BRUCELLA en sueros ovinos y caprinos.

Indirect immunoenzymatic assay for specific detection of serum antibodies to *Brucella* in ovine and caprine samples.

Última revisión / Last revision: 27-05-13  
Registrado por el MAPA nº 3057-RD

COMPOSICIÓN DEL KIT  
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	2 Placas (T) 2 Plates		5 Placas (T) 5 Plates	
	Unid	vol	Unid	vol
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8)	2	-	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo Vials containing Positive Control sera	1	100 µl	2	100 µl
Viales conteniendo suero Control Negativo Vials containing Negative Control sera	1	100 µl	2	100 µl
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) concentrado 100x. Vials with conjugate 100x concentrated (MAb peroxidase conjugated)	1	300 µl	2	300 µl
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-05), concentrado 5x Bottles containing diluent (DE01-05), 5x concentrated	1	100 ml	1	100 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso. Bottles containing substrate (TMB) ready to use	1	30 ml	1	60 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. Bottles containing stop solution	1	60 ml	1	60 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 TÉCNICO DEL KIT

Las especies de *Brucella*, 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 tiene como objetivo la detección de anticuerpos anti-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 Melitensis* purificado.

Cuando sobre la placa se dispensan los sueros 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 ovinas o caprinas mediante un conjugado de peroxidasa específico, 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, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
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. ¡¡IMPORTANTE! 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

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C.

**Una vez abiertos**, los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizaciones.

## 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. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Utilizar la dilución de sueros 1/100 ( por ejemplo 5 µl de muestra + 495 µl de diluyente).

## VI. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

### • *Solución de lavado:*

Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada (40 ml de concentrada más 960 ml de agua).

### • *Diluyente:*

Diluir una parte de diluyente (5x) con 4 partes de agua destilada. Una vez preparada la solución, permanece estable entre +2°C y +8°C.

### • *Control (+) y (-):*

Los sueros controles se ensayan como las muestras problema. Realizar la dilución 1/100 en el diluyente (5 µl de suero en 0,5 ml de diluyente 1x). **Una vez abiertos**, los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizations

### • *Preparación del conjugado: A realizar inmediatamente antes de su utilización.*

Realizar una dilución 1/100 en diluyente 1x preparado según instrucciones:

- Para una tira de 8 pocillos recomendamos diluir 10 µl de conjugado concentrado hasta 1 ml de diluyente.
- Para una placa completa recomendamos diluir 110 µl de conjugado hasta 11 ml de diluyente.

Homogenizar bien la solución antes de su utilización.

*ATENCIÓN:* preparar inmediatamente antes de su utilización. Preparar únicamente la cantidad estrictamente necesaria, ya que el volumen sobrante debe ser desechado.

## VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl de cada una de las diluciones de suero a testar en cada uno de los pocillos de la placa. Recomendamos la realización de las muestras por duplicado. Añadir 100 µl de los controles diluidos a cada pocillo destinado para control. Tapar la placa e incubar **1h a temperatura ambiente (20-25°C)**
3. Lavar 4 veces según procedimiento anterior.
4. Añadir 100 µl del Conjugado, preparado según instrucciones anteriores, a cada pocillo. Tapar la placa e incubar a **30 min a temperatura ambiente. (20-25°C)**.
5. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Mantener la reacción durante **5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.**

7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Es recomendable añadir en el mismo sentido en que se dispensó el sustrato.
8. Leer a 450nm de longitud de onda en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

## VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

### A. Validación del índice de positividad:

El kit se considerará válido cuando:

- La Abs 450 nm del Control (+) es mayor de 1.
- La Abs 450 nm del Control (-) es menor de 0.25

### B. Cálculo del índice de positividad (IP):

Par calcular el IP de una muestra se determinan la relación:

$$\frac{A_{450} \text{ muestra}}{A_{450} \text{ C+}} \times 100$$

### C. Interpretación de resultados

- Las muestras con  $IP \geq 25\%$  cut se consideran positivas.
- Las muestras con valores menores al 25% serán negativas.

## IX. INFORMACIÓN ADICIONAL:

Este ensayo ha sido autorizado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente para su utilización en animales no vacunados de rebaños y zonas oficialmente libres de infección. La técnica ELISA no está aprobada para el diagnóstico oficial según el Real Decreto 2611/1996 por lo tanto no tiene valor diagnóstico. Sólo para investigación.

## 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 used antigen is a purified extract of the LPS of Brucella Melitensis. The serum sample is added to each well. After incubation and

washing we add a labelled monoclonal antibody (peroxidase conjugated) specific to ruminant 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.
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 a 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 handled with care, it is very sensible to light and contamination.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

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

**Once opened**, control sera are stable for one month. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to store them at -20°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.

## V. PREPARATION OF SAMPLES:

The sera samples need to be at 1/100 dilution (i.e. 5µl of serum with 495 µl of diluent).

## VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**  
Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into 24 parts of distilled or deionized water (40 ml of concentrated solution and 960 ml of water). When ready this solution remains stable stored at 4°C.
- **Preparation of control sera (+) and (-):**  
Controls are used as samples. You must do the 1/100 dilution in diluent. Once opened, controls are stable between +2°C and +8°C for 4 week. Otherwise we recommended storing the control sera at -20°C in aliquots.
- **Preparation of Diluent:**  
Dilute 1 volume of diluent 5x concentrated supplied in the Kit with 4 volumes of distilled or deionized water (100 ml of concentrate plus 400 ml of water).
- **Preparation of the conjugate: to make immediately before use.**  
Dilute 1/100 with diluent 1x prepared as it is described at point "Preparation of 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 8 wells strip is 10 µl of conjugate in 1 ml of diluent.

Homogenize the solution before use.

**ATTENTION:** Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

## VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to bring room temperature before use.
2. Add 100 µl of diluted Positive and Negative control serum to their respective wells,  
  
Add samples (diluted as it's specified in the previous instructions) to remainder wells of the plate. 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 3 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 (+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 criteria:

The test is considered valid when:

- OD of the positive control is higher than 1.0
- OD of the negative control is lower than 0.25.

### B. Positivity index (IP) calculation:

IP of the sample:

$$\frac{OD_{450} \text{ Sample}}{OD_{450} \text{ C+}} \times 100$$

### C. Results Interpretation:

When you are running duplicate samples, OD values will be calculated for each sample as the arithmetic mean of both values<sup>3</sup>

- All samples with IP ≥ than 25% must be considered as Positives.
- All samples with IP lower than 25% will be considered as Negatives.

Desarrollado y fabricado en España 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](mailto:ingenasa@ingenasa.com)  
[www.ingenasa.es](http://www.ingenasa.es)

Distributed in \_\_\_\_\_ by:

