



INgezim *Brucella ovis*

Prod Ref: 13.BO.K1

Ensayo inmunoenzimático indirecto para la detección y/o cuantificación de anticuerpos específicos frente a *Brucella ovis* en suero de carnero.

Indirect immunoenzymatic assay for specific detection and/or titration of serum antibodies to *Brucella ovis* in ram's serum.

Última revisión / Last revisión: 20-03-15
Nº registro en España / Spanish registration number: 3375-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, listo para uso Vials containing Positive Control sera, reasy to use	1	2 ml	2	2 ml
Viales conteniendo suero Control Negativo, listo para uso Vials containing Negative Control sera, ready to use	1	2 ml	2	2 ml
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) concentrado 100x. Vials with conjugate 100x concentrated (MAb peroxidase conjugated)	1	350 µl	2	350 µl
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE14-01) Bottles containing diluent (DE14-01)	2	125 ml	3	125 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 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 ovis 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 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. La solución de frenado es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.
7. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
8. No pipetear los reactivos con la boca.
9. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
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. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes 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. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Para el ensayo de los sueros, se realiza la dilución 1/100 de los mismos (**Por ej.:** 5µl de suero en 500

µl de diluyente). Para titular se pueden realizar las diluciones que se deseen en base 2 a partir de ésta.

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).

• Control (+) y (-):

Los sueros controles vienen listos para su uso. NO DILUIR.

INgezim Brucella ovis 13.BO.K1

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

Realizar una dilución 1/100 en diluyente.

- 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 a cada pocillo destinado para control. **Tapar la placa e incubar 1h a 37°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 37°C.**
5. Lavar 6 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Mantener la reacción **durante 10 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 dispuso 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 test:

El kit se considerará válido cuando:

- La Abs 450 nm del Control (+) es mayor de 0.7.
- La Abs 450 nm del Control (-) es menor de 0.25

B. Cálculo del cut off:

El punto de corte se calcula basándose en el valor medio de absorbancia del control positivo.

- $\text{Cut Off} = \text{Abs 450 nm Control (+)} \times 0,38$

C. Interpretación de resultados

- *Para screening:*

- Las muestras con valores de absorbancia mayores al cut off se consideran positivas.
- Las muestras con valores menores al cut off serán negativas.

- *Muestras comprometidas*

Valores entre el punto de corte $\pm 10\%$

Las muestras que presenten valores de absorbancia en la que podría denominarse "Zona Gris" (punto de corte $\pm 10\%$), se recomienda que se repitan. Si la muestra repetida se mantiene en la zona gris recomendamos se ensaye una nueva muestra de una segunda extracción de sangre, tomada como mínimo, 15 días después de realizada la primera.

Todas las muestras comprometidas (es decir en la "zona gris") deberán confirmarse

- *Para título:*

Este será la máxima dilución que presente un valor de absorbancia superior al punto de corte.

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 BRUCELA 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 ovis. 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. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
7. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled.
8. Do not pipette by mouth.
9. Use a new tip for each serum sample.
10. Substrate must be handle with care, it is very sensible to light and contamination.
11. For each utilisation of the Kit, control positive and negative serum must be tested.

III. STORAGE OF COMPONENTS

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

V. PREPARATION OF SAMPLES:

- *For screening purposes:*

Sera samples must be diluted at 1/100 dilution (i.e. 5µl of serum with 495 µl of diluent).

- *For titration purposes:*

Prepare 2-fold dilution of individual samples, starting from 1/100 to the point you consider adequate for your purposes (1/100, 1/200, 1/400 , 1/800, etc).

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 supplied ready to use. DO NOT DILUTE.

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

Dilute 1/100 with diluent 1x .

- 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 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 37°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 37°C.**
5. Wash 6 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate in darkness for **10 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 0.7
- OD of the negative control is lower than 0.25.

B. Cut off calculation:

- Cut off = OD of positive control x 0.38

C. Results Interpretation:

- *For screening:*

If samples have been run in duplicate, 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 Positives.
- All samples with OD values lower than the CUT OFF values will be considered as Negatives.

- *Awkward samples*

OD values between Cut off \pm 10%

Samples showing OD into this range ("Grey zone") should be considered doubtful and retested. If the result is the same we recommend to assay a new extraction taken off 15 days after the first one.

All awkward (grey zone) samples must be confirmed.

- *For titration:*

The titre of the sample will be the higher dilution with an OD higher than the Cut off value

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)
Tif: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es



Distributed in

by: