



INGEZIM BRUCELLA PORCINA

Prod Ref: 11.BP.K.1

Ensayo inmunoenzimático indirecto
para la detección de anticuerpos
específicos frente a Brucella en suero
de ganado porcino

Indirect immunoenzymatic assay for
specific detection of antibodies to
Brucella in swine serum samples.

Última revisión / Last revision: 27-05-13
Nº registro en España / Spanish registration number: 3462-RD

COMPOSICION DEL KIT ELISA
ELISA KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	PRESENTACION (2 Placas) PRESENTATION (2 Plates)		PRESENTACION (5 Placas) PRESENTATION (5 Plates)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration coated plates (divided in 12 strips of 8 wells each)	2	-	5	-
Viales de Control Positivo Vials positive control	1	0,25 ml	1	0,25 ml
Viales de Control Negativo Vials negative control	1	0,25 ml	1	0,25 ml
Viales de Conjugado Específico 100x Vials with conjugate (100x concentrated)	1	0,35 ml	2	0,35 ml
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Diluyente DE14 Bottles with diluent DE14	1	125 ml	3	125 ml
Frascos de Sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with Substrate (TMB) ready to use	1	30 ml	1	60 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with 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)
Placa vacía de 96 pocillos

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

I. FUNDAMENTO TECNICO 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.

Nuestro kit tiene como objetivo 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 antigenico del agente causal. En este caso se

trata de un extracto del LPS de Brucella 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 porcinas mediante un conjugado específico (anticuerpo monoclonal anti-IgG porcina 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. Usar únicamente agua destilada para la preparación de los reactivos.
9. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Retirar del frasco la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al frasco el sustrato sobrante.
10. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
11. La solución de frenado es un ácido. Manipular con precaución

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2 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. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de sosa, ya que las muestras problema pueden contener agentes infectivos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado Tras el 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 REACTIVOS:

• Solucion de lavado:

Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada.

INGEZIM BRUCELLA PORCINA

11.BP.K.1

• Preparación de conjugado:

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).

• Preparación de los controles (+) y (-)

Se procesan igual que las muestras. Una vez abiertos, son estables durante 4 semanas entre +2°C y +8°C por lo que si se prevé su uso a mas largo plazo se recomienda su distribución en alícuotas y su conservación a -20°C

VI. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Diluir 1/25 en diluyente (En una placa vacía añadir 240µl de diluyente por pocillo y 10µl de suero problema ó controles). Agitar para homogeneizar y luego añadir 100 µl/pocillo.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl/pocillo de cada una de las diluciones de suero a testar . Añadir 100 µl de los controles diluidos como se indica previamente, en último lugar. Tanto los controles como las muestras, es recomendable hacerlas por duplicado Mantener 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C).
3. Lavar 4 veces según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl de conjugado/pocillo preparado según se indica en punto VI. Tapar la placa e incubar a 30 min a temperatura ambiente.
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 en el mismo orden en que se dispensó el sustrato.
8. Leer los valores de absorbancia a 450 nm en los 5 min siguientes 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. Validación de resultados:

- La DO a 450 nm del C (+) debe ser > 1
- La DO a 450 nm del C (-) debe ser < 0,3

B. Cálculo del valor M/P:

$$M/P = DO \text{ muestra} / DO \text{ control+}$$

C. Interpretación de resultados:

- Las muestras con M/P mayores o iguales que 0,25 se consideran positivas.
- Las muestras con M/P menores que 0,25 serán consideradas como negativas.

Teniendo en cuenta la similitud antigénica entre el LPS de Brucella y el de Yersinia enterocolítica O9, se recomienda que los sueros que resulten positivos en éste ensayo se confirmen utilizando otra técnica analítica.

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 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. The serum sample is added to each well. After incubation and washing we add a labelled monoclonal antibody (peroxidase conjugated) specific to pig IgG. 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 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 a new tip for each serum sample.
9. Substrate and substrate buffer must be handled with care.
10. For each utilisation of the Kit, positive and negative control sera must be tested in a systematic way.
11. Stop solution may precipitate at +4°C. When it happens, warm at 37°C before use.

III. STORAGE OF COMPONENTS

Plates and reagents 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.

INGEZIM BRUCELLA PORCINA 11.BP.K.1

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. Once ready, this solution remains stable at +4°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.

Mix thoroughly the solution before use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

- **Control Sera:**

Controls are used as samples. You must do the 1/25 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.

VI. PREPARATION OF SAMPLES

The sera samples need to be at 1/25 dilution. We recommend to do this dilution in an empty plate (i.e. 240µl of diluent and 10 µl of each serum, samples or controls). Shake well in order to homogenate and add 100 µl / well.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to 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 (not mandatory) running samples and control in duplicate for confirmatory 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.
5. Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate in darkness for **5 min at room temperature.**
6. Add 100 µl of stop solution to each well.
7. 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:

The test is considered valid when:

OD value of the positive control is higher than 1.0 and the OD value of the negative control is lower than 0.3

B. S/P calculation:

$$S/P = DO \text{ sample} / DO \text{ control} +$$

C. Interpretation of the results:

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

- All samples with S/P higher than or equal to 0.25 should be considered as Positive.
- All samples with S/P value lower than 0.25 should be considered as Negative.
- LPS of Brucella and Yersinia O9 share similar antigenic determinants so, some cross reaction could be obtained.

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 91.368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es

Distributed in _____ by:

