

INGEZIM AGID

Prod Ref: 12.BB2.K7

Ensayo de inmuno-difusión en gel de Agar (AGID) para la detección de anticuerpos específicos presentes en suero de bovinos infectados con *Brucella abortus* y *melitensis*.

Agar Gel immuno-diffusion (AGID) assay for the detection of specific antibodies present in bovine serum samples infected with *Brucella abortus* and *melitensis*.

Última revisión / Last revision: 29-01-18

COMPOSICIÓN DEL KIT

KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT		
	Unid	Vol
Placas de agar donde se han practicado 14 pocillos por placa. Agar plates with 14 wells per plate	6	-
Suero Control Positivo para Brucella Positive Control serum For Brucella	1 vial	200µl
Suero Control Negativo para Brucella Negative Control serum for Brucella	1 vial	200µl
Antígeno (LPS+NH) Antigen (LPS+NH)	1 vial	200µl

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT

Micropipetas de 5 a 200 µl.
Puntas de micropipeta de un solo uso

Micropipettes from 5 to 200 µl.
Disposable micropipette tips.

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Con la prueba de doble difusión en gel de agar, se puede detectar la presencia de anticuerpos frente a Brucella. Esta técnica se basa en el uso de un extracto antigénico rico en Lipopolisacárido (LPS) y otro antígeno polisacárido denominado HN (ambos presentes en la membrana celular) Este antígeno y los anticuerpos presentes en un suero positivo difunden

por un gel de agarosa y al producirse la unión Antígeno-Anticuerpo, se forma un complejo que precipita dando lugar a unas bandas visibles bajo una adecuada iluminación. Gracias al uso de los dos antígenos, el ensayo permite a su vez la diferenciación entre animales vacunados e infectados.

II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
3. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
4. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
5. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
6. No pipetear los reactivos con la boca.
7. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
8. Incluir sistemáticamente un control positivo un control negativo siempre que se utilice el kit.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

El agar de las placas puede sufrir alteraciones en función de las condiciones de conservación. Es por ello recomendable almacenarlas en condiciones que eviten su desecación: mantener las placas siempre bien cerradas y boca abajo (para evitar que las gotas de condensación de la tapa caigan sobre la capa de agar), a temperatura entre +2°C y +8°C.

Los controles positivos y negativos, junto con el antígeno deben mantenerse congelados. En el caso de realizarse utilizaciones parciales del kit, resultaría conveniente realizar una distribución de los sueros controles en alícuotas con el fin de evitar sucesivas congelaciones y descongelaciones de los mismos.

IV. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

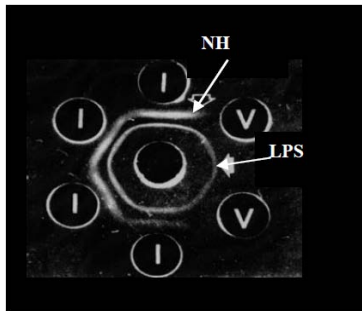
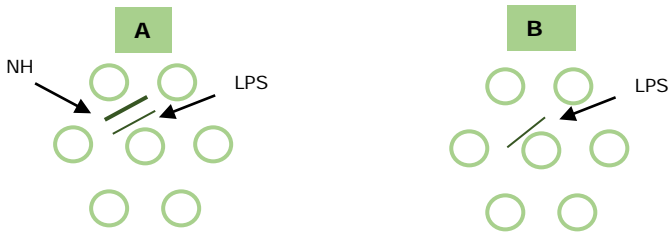
1. Dispensar 15µl de control positivo y de control negativo en dos de los pocillos laterales
2. Dispensar 15µl de los sueros problema en los pocillos laterales restantes.
3. Dispensar la misma cantidad (15µl) de antígeno en el pocillo central.
4. Las placas así inoculadas se incuban en cámara húmeda a Temperatura Ambiente (T.A.). Incubar entre 24 y 48 horas.

V. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La lectura de los resultados se realiza a las 24 y 48 horas, con iluminación oblicua.

A. Interpretación de resultados:

- Si no hay líneas de precipitación, significa que el animal no está infectado
- La presencia de líneas de precipitación puede significar:
 - a. Doble banda (la banda correspondiente al antígeno NH se observa más cerca del pocillo del suero y la banda correspondiente al antígeno LPS, cerca del pocillo central). Significa que el animal está infectado y probablemente esté excretando la bacteria. Algunos animales muy recientemente vacunados (2 meses o menos después de la vacunación) pueden producir también esta doble banda de precipitación característica de animales infectados.
 - b. Una única banda correspondiente al antígeno LPS. Esta reacción se presenta transitoriamente en animales vacunados, si bien puede darse en una proporción relativamente baja en animales infectados (que reaccionan solamente con la banda de LPS en lugar de con ambos antígenos, LPS y NH)



I. TECHNICAL BASIS

The AGID technique allows to detect presence of antibodies specific of Brucella in serum. This technique is based on the use of an antigen containing mainly lipopolysaccharide (PLS) and another polysaccharide named HN (both of them present in the cellular membrane). This antigen and the antibodies present in a positive serum diffuse through the

agarosa gel to form a complex. When the complex is formed it precipitates and the reaction is manifested by the development of a visible line of precipitate in the interface. Due to the use of these 2 antigens, the assay allows to distinguish between infected and vaccinated animals.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions of use carefully.
2. Do not mix reagents or use instructions from different kits.
3. Avoid any contamination of the kit reagents.
4. Do not use components after expiry dates and do not mix components from different lots.
5. There should be no eating, drinking, or smoking while handling reagents or samples.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. Systematically include a positive control and a negative serum each time the assay is run.

III. STORAGE OF COMPONENTS

The agar from the plate may be altered depending on the storage conditions. It is therefore recommended to store them in conditions that prevent desiccation: always keep the plates well closed and upside down (to prevent condensation drops in the lid from falling onto the agar layer), and at

temperatures between +2 ° C and +8 ° C.

The positive and negative controls and antigen should be kept frozen. For partial uses of the kit, it is convenient to aliquot these reagents in order to avoid their continuous freezing and thawing.

IV. TEST PROCEDURE

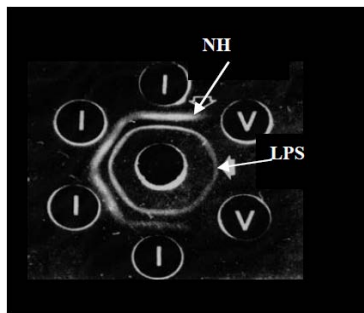
1. Dispense 15 µl of positive control and 15 µl of negative control into 2 lateral wells.
2. Dispense 15 µl of each serum in the rest lateral wells
3. Dispense 15 µl of antigen into the central well.
4. The thus inoculated plates are incubated in a humid chamber at room temperature. Incubate the plate at room temperature for 24-48 hours

V. LECTURE AND RESULT INTERRETATION

The results are read after 24 and 48 hours, with oblique illumination.

A. Interpretation of the results:

- The absence of precipitation lines means that the animal is not infected.
- The presence of precipitation lines can mean:
 - a. **Double band** (the band corresponding to the NH antigen is observed closer to the serum well, and the band corresponding to the LPS antigen, near the central well). It means that the animal is infected and is probably excreting the bacteria. Some very recently vaccinated animals (two months or less after vaccination) could also produce that double band of precipitation, characteristic of infected animals.
 - b. **A single band** corresponding to the LPS antigen. This reaction occurs transiently in vaccinated animals, although it could occur in a relatively low proportion of infected animals (which react only with the LPS band instead of with both antigens, LPS and NH).



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



IT-73840
IT-73780



ISO 14001:2015
9191.INGE



ISO 9001:2015
9175.ING2

Distributed in

by:

