INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA S.A.

INGENASA

INgezim BRUCELLA COMPAC 2.0
(MULTIESPECIE)

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos de LPS de *Brucella*

Código: **R.10.BRU.K3**
Artículo:
Certificado: Exp.S05:0003779/2017

IMMUNOLOGY
REACTIVOS PARA DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN VETERINARIA

senasa
Certificado SENASA
Exp.S05:0003779/2017
Uso profesional Exclusivo

I . FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente al LPS de Brucella siendo capaz de detectar títulos bajos de anticuerpos en sueros de animales infectados de diferentes especies (bovino, ovino, caprino, cerdo, etc). La base técnica del kit, es la del ensayo inmunoenzimático (ELISA) de bloqueo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación.
Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el LPS de Brucella abortus. Cuando las muestras de suero se depositan sobre la placa, en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un Anticuerpo monoclonal especifico del LPS (epítopo C) conjugado con peroxidasa En el caso de que las muestras contuvieran anticuerpos frente al LPS, estos no permitirían la unión del conjugado, mientras que si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el conjugado se unirá libremente al antígeno de la placa.
Tras sucesivos lavados para eliminar el material no unido, podremos revelar las reacciones acontecidas en la placa mediante la adición del sustrato adecuado el cual, desarrollará una reacción colorimétrica en presencia de peroxidasa (es decir en presencia del monoclonal conjugado con peroxidasa). De este modo la aparición de una reacción coloreada, indicará que la muestra ensayada no contenía anticuerpos específicos del LPS de Brucella spp. y la ausencia de color indicará que la muestra es positiva y contiene dichos anticuerpos.

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 +2ºC y 8ºC).

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

a) **Sueros ovinos y caprinos:** Realizar una dilución 1/5 en diluyente. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 80 µl de diluyente y luego 20 µl de la muestra.
b) **Sueros bovinos y porcinos:** Realizar la dilución 1/10 (90 µl de diluyente y 10 µl de suero). Agitar suavemente para una correcta homogeneización de la mezcla.

VI. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- ***Controles y conjugados***
  Se presentan listos para su uso. No es necesaria dilución alguna.
- ***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 +2ºC y +8ºC.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrarodos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de los sueros:** Añadir la dilución adecuada según la especie de que se trate (ver punto V). Añadir 100 µl de los controles positivo y negativo (es recomendable usar dos pocillos por control). Agitar suavemente, tapar la placa e incubar durante **1 hora a temperatura ambiente**
3. Lavar 4 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µl de conjugado listo para su uso a cada pocillo. Tapar la placa e incubar **1 hora a temperatura ambiente.**
5. Lavar 4 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir a cada pocillo de la placa 100 µl de sustrato. Incubar durante **10 minutos a temperatura ambiente.** (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. ATENCION: La solución de frenado ha de dispensarse en el mismo orden en que se añadió la solución sustrato.
8. Leer los valores de absorbancia a 450nm en los 5 min. Siguientes a la adición de la solución de frenado

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la media aritmética de los dos valores de DO a 450nm obtenidos. Igualmente, se realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para el control positivo, y los dos pocillos para el control negativo

A. VALIDACION DE RESULTADOS:

- El valor de absorbancia (DO 450nm) del control negativo (CN) debe ser mayor de 1.
- El valor de absorbancia (DO 450nm) del control positivo (CP) ha de ser menor de 0.35

B. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Calcular el porcentaje de inhibición (PI) de cada muestra según la siguiente fórmula:

PI = 100 x [1-(DO muestra / DO control negativo)]

Muestras con PI ≥ 40% se consideran positivas para anticuerpos específicos de Brucella.
Muestras con PI < 40% se consideran negativas para anticuerpos específicos de Brucella.

IX. INFORMACIÓN ADICIONAL

Este ensayo ha sido autorizado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente para su utilización en las siguientes condiciones:

√ Especie bovina y porcina: Técnica aprobada para el diagnóstico oficial según normativa (RD 2611/1996, Directiva 64/432/CEE, Decisión 2012/137/UE).

√ Especie ovina y caprina: 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 España. Sólo para investigación.

Composición del Kit ELISA

REACTIVO	2 PLACAS (T)		5 PLACAS (T)	
	Unid.	Vol.	Unid.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras	2	–	5	–
Viales conteniendo Control Positivo para Brucella listo para uso	1 vial	2.5 ml	2 vial	2.5 ml
Viales conteniendo Control Negativo para Brucella listo para uso	1 vial	2.5 ml	2 vial	2.5 ml
Viales conteniendo conjugado Específico para su uso	1 vial	30 ml	2 vial	30 ml
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x.	1 frasco	125 ml	1 frasco	125 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-01)	1 frasco	125 ml	1 frasco	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso	1 frasco	30 ml	1 frasco	60 ml
Frascos conteniendo solución de frenado	1 frasco	60 ml	1 frasco	60 ml

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL 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)

MANTENER FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS

TELEFONO CENTRO NACIONAL DE INTOXICACIONES: 0800 333 0160 / (11) 4654 6648 / 7777

IMPORTADOR
Av. Rivadavia 1367 • Piso 16 • (C1033AAD)
C.A.B.A. • ARGENTINA
Tel. (011) 3221 2569 • Fax: (011) 3221 2100 Int. 2569
info@immunology.com.ar

IMMUNOLOGY
REACTIVOS PARA DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN VETERINARIA