

ellie

Código: **B1001ARG**

Artículo:

Certificado: 19-056

BRUCELLA FPA

KIT PARA LA DETECCION DE Ac DE *Brucella abortus*

El ensayo de FPA para *Brucella* utiliza la tecnología de polarización de fluorescencia y permite determinar la presencia de anticuerpos de *Brucella abortus* en suero sanguíneo de animales susceptibles. La presencia de anticuerpos indica una infección previa con *Brucella abortus* o una vacunación con cepa lisa (cepa 19). Los bovinos o búfalos vacunados con cepa rugosa (por ej. RB 51) no reaccionan positivamente en este ensayo. Este ensayo tiene la capacidad de ser una prueba multi-especies, permitiendo el diagnóstico presuntivo en bovinos, porcinos, caprinos, ovinos y ciervos y bisontes. El ensayo diagnóstico emplea un O-poli sacárido (OPS) extraído de la pared celular de la bacteria *Brucella abortus* que se conjuga con fluoresceína (un marcador fluorescente). El instrumento FPA (Lector de microplacas multimodal o Lector de Tubos de Fluorescencia Polarizada) es utilizado para medir el estado de polarización de la luz emitida por el conjugado OPS. Cuando no hay anticuerpos presentes en el suero sanguíneo, la polarización es baja. Cuando los anticuerpos se ligan al conjugado, la polarización aumenta.

Contenido del kit

	<u>250 Tests</u>	<u>1000 Tests</u>
Control Positivo	1 ml	1 ml
Control Negativo	2 ml	2 ml
Diluyente para Muestras 25X	50 ml	50 ml
Conjugado	2.5 ml	10 ml

Materiales necesarios pero no suministrados

Otros materiales necesarios, pero no suministrados con el kit son: instrumento analizador de FPA, tubos de ensayo de borosilicato de 10 x 75mm para instrumento analizador de FPA de un tubo (recomendación: VWR, VWRM47729-568), micropipeta, puntas, agitador Vortex. En el caso de analizador de placa se requieren placas de microtitulación negras de 96 pozos (recomendación Corning Costar® #3590). No se necesitan otros reactivos, con la excepción de agua destilada para la reconstitución del buffer.

Almacenamiento y estabilidad

Los reactivos FPA deben almacenarse en un refrigerador (entre 2°C y 8°C) y llevarse a temperatura ambiente (18-25°C) antes del empleo. Refrigerar el Diluyente para Muestras 25X a 2-8 °C o almacenar a temperatura ambiente. Almacenar el Conjugado a 2-8°C. Para períodos más largos de almacenamiento, alicuotar los controles y almacenarlos a -20°C o menor. El kit es transportado en una caja refrigerada a temperatura entre 0 y 15°C. No usar el kit de ensayo después de la fecha de caducidad que figura en la caja.

Precauciones

Las medidas de polarización se ven afectadas por la temperatura, **todos los reactivos utilizados en la prueba deben estar a la misma temperatura y muestras utilizadas**. Evítese variaciones de temperatura durante el ensayo. Evitar pipeteo que cree burbujas. Utilizar pipetas calibradas de buena calidad. Evitar las prácticas que puedan contaminar los reactivos. Todos los materiales de este kit deben ser tratados como cualquier otro material de laboratorio. Evítese su ingestión, el contacto con los ojos y cualquier otra exposición es potencialmente nociva. **Todos los componentes contienen menos de 0,1% de acida sódica.**

No usar los componentes después de la fecha de caducidad, ni utilizar tampoco componentes contaminados o de otros kits. No mezclar componentes de diferentes lotes de fabricación. Evite el uso de tubos de ensayo rayados, que presenten defectos cerca de la zona de medida o contengan restos o fragmentos de vidrio en su interior. Los instrumentos utilizados para leer los resultados de la prueba deben ser obtenidos de o aprobados por Ellie. De lo contrario, no se garantiza su rendimiento ni la garantía.

Pasos Preliminares

Preparación de reactivo y muestra: **1.** Espere hasta que los reactivos y las muestras hayan alcanzado la temperatura ambiente (18° - 25°C). **2.** Preparar el **Diluyente para Muestras** diluido mezclando una parte del buffer concentrado 25X con 24 partes de agua destilada o desionizada. La solución diluida no debe contener partículas y puede almacenarse a temperatura ambiente durante un mes

Dilución Diluyente para Muestras 25X				
N° Muestras	Tubos (µl)		Pocillos (µl)	
	Diluyente	Agua Dest.	Diluyente	Agua Dest.
8	320	7680	50	1390
10	400	9600	100	1700
12	480	11520	110	2050
16	640	15360	120	2760
20	800	19200	150	3450
30	1200	28800	220	5180
40	1600	38400	290	6910
50	2000	48000	360	8640
70	2800	67200	500	12100
96	3840	92160	700	16580
100	4000	96000	750	17250

NOTA:

Recomendamos preparar más Diluyente para Muestras que la cantidad de volumen exacto para su cantidad de muestras. Los controles son tomados en cuenta como muestras.

3. Las muestras deben estar libres de partículas. Centrifugar todas las muestras que contengan cualquier partícula visible. Muestras hemolizadas son aceptables para el ensayo. Las muestras liofilizadas deben ser completamente reconstituidas y las congeladas, totalmente descongeladas.

Procedimiento del Ensayo

Procedimiento de la prueba en Tubos (Equipos serie Sentry 200)

1. Dispensar **1ml** Diluyente para Muestras diluido en los tubos de 10x75mm de borosilicato. Evite el uso de tubos que estén rallados, o tengan defectos, detrimento o fragmentos de vidrio cerca del área de lectura.
2. Dispensar **10 µl** de muestras y controles en los tubos. Haga los Controles Negativos en triplicado y mezcle bien con vortex evitando la formación de espuma
3. Incubar por 3-30 minutos a temperatura ambiente.
4. Obtener las lecturas blanco de todas las muestras y controles.
5. Agregar **10 µl** de Conjugado en todos los tubos que contengan controles y muestras. Mezcle bien.
6. Incubar por 3-5 minutos a temperatura ambiente (18 - 25°C).
7. Obtener lecturas mP de todas las muestras y controles. Leer las muestras exactamente en el mismo orden que fueron blanqueadas.

Procedimiento de la prueba en Tiras (Equipos serie Sentry 2000 y otros)

1. Pipetear **20 µl** de muestras y controles en los pocillos de las tiras de placa de microtitulación negra. Haga los Controles Negativos en triplicado. Tenga cuidado y evite la formación de burbujas cuando pipetee dentro de cada pocillo.

NOTA: Cuando haga el ensayo en tiras, repita los controles cada 60 muestras.

2. Pipetear **180µl** de Diluyente para Muestras en todos los pocillos de la tira o placa de microtitulación negra. Mezcle cuidadosamente.
3. Incubar por 3-30 minutos a temperatura ambiente (18 - 25°C).
4. Obtener las lecturas blanco de todas las muestras y controles.
5. Agregar **10 µl** de Conjugado en todos los pocillos que contengan controles o muestras. Mezcle cuidadosamente.
6. Incubar por 3-5 minutos a temperatura ambiente (18 - 25°C).
7. Obtener lecturas mP de todas las muestras y controles.

Validación del Ensayo

1. El Control Negativo debe dar una medida entre 65 a 80 mP.
2. El Control Positivo debe dar una medida entre 120 y 250 mP.
3. Si el control negativo o el control positivo presentan valores fuera de estas especificaciones se debe repetir el ensayo. Si los valores están todavía fuera de las especificaciones máxima o mínima, el instrumento deberá calibrarse nuevamente siguiendo los procedimientos descritos en el manual de instrumento.

Resultados e Interpretación

La interpretación de los resultados se hará de acuerdo con las normas oficiales vigentes en cada país o región sanitaria correspondiente.

En Argentina, el SENASA aplica el siguiente rango de valores para diagnosticar animales bovinos

Negativo	Sospechoso	Positivo
<94 mP	94-104 mP	>105 mP

La interpretación del resultado obtenido debe realizarse de acuerdo con las normativas establecidas para esta técnica en el Manual de Procedimiento del SENASA. Para la interpretación de resultados en animales diferentes al bovino con infecciones brucélicas por cepas lisas, se recomienda ajustarse a los procedimientos oficiales de SENASA y obtener de un laboratorio de referencia, sueros controles positivos y negativos de la especie correspondiente.

Información Adicional

Calidad de las Muestras

Se pueden analizar muestras hemolizadas. Las muestras degradadas con hemólisis negra o con alto contenido bacteriano, no son apropiadas para el análisis.

Influencia de la Temperatura

La temperatura afecta las lecturas de fluorescencia polarizada. En el caso de pruebas realizadas en el Lector de Tubo de Fluorescencia Polarizada, el valor disminuye 3 mP (unidades de milipolarización) con un aumento de la temperatura de 4°C. Por esta razón, la prueba de Control Negativo debe efectuarse tres veces a intervalos regulares. Deben evitarse los cambios de temperatura de más de 1°C durante cada determinación.

Referencias

Aprobado por el Servicio Agrícola y Ganadero (S.A.G.)
Resolución Exenta N°1503, Ministerio de Agricultura, Chile
US Patent No. 5,976,820; 1999.
OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines, 2004.
EU Council Directive 64/432/EEC, 2008.

Soporte Técnico

ellie Ellie LLC • N114 W19320 Clinton Drive, Unit 5, Germantown, WI 53022, U.S.A.
Phone/Fax: (800) 556-6953 • support@ellielab.com

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