



Instructions for Use

Brucella Ab vet ELISA

VET

REF EIA-6065

Σ 96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Tabla de Contenidos

1	INTRODUCTION.....	2
2	INTENDED USE.....	2
3	PRINCIPLE OF THE ASSAY	2
4	MATERIALS.....	3
5	STABILITY AND STORAGE	3
6	REAGENT PREPARATION	4
7	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....	4
8	ASSAY PROCEDURE	5
9	RESULTS.....	6
10	SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	6
11	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	7
12	PRECAUTIONS AND WARNINGS	7
1	INTRODUCCIÓN	8
2	USO PREVISTO	8
3	PRINCIPIO DEL ENSAYO	8
4	MATERIALES.....	9
5	ESTABILIDAD Y ALMACENAJE.....	9
6	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	10
7	TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	10
8	PROCEDIMIENTO	11
9	CALCULO DE LOS RESULTADOS	12
10	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	12
11	LIMITACIONES DEL ENSAYO	13
12	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	13
13	BIBLIOGRAPHY BIBLIOGRAFÍA.....	14

1 INTRODUCTION

Brucella species are very small, gram-negative immobile bacteria (0.4 - 0.8 µm in diameter and 0.4 - 3.0 µm in length). They were named after the English military doctor Bruce Davis, who isolated the pathogen 1887 on Malta from the spleen of a deceased soldier with undulating fever.

Especially following four species are of importance:

- Brucella abortus - causative agent of bovine brucellosis
- Brucella melitensis - causative agent of ovine and caprine brucellosis
- Brucella suis - causative agent of porcine brucellosis
- Brucella canis - causative agent of canine brucellosis

The symptoms of the disease are similar in cattle, sheep, goats and pigs. Sheep seem to be less susceptible so less frequently abortion is observed in this species.

After infection, brucellosis begins with a clinically normal phase which is often unnoticed. Later there are often joint inflammation, and sometimes mastitis. The main symptoms of brucellosis are abortions, premature births and birth of dead or weak offspring.

Infected bulls can develop orchitis and epididymitis.

The pathogen is transmitted mainly by ingestion and mating. Infection by milk, urine and faeces is also possible. In livestock brucellosis can become epidemic.

Brucellosis is a transmitted disease to humans (zoonosis). Individuals in risk are especially shepherds, farmers, animal keepers, veterinarians and laboratory staff.

Infections may be diagnosed:

- By genus specific PCR
- Serology: Detection of antibodies by ELISA

2 INTENDED USE

The Brucella Ab vet ELISA is intended for the qualitative determination of antibodies against Brucella in **veterinary serum, pooled serum samples and milk samples**.

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

4 MATERIALS

4.1 Reagents supplied

- **Microtiterplate:**
12 break-apart 8-well snap-off strips coated with Brucella antigens; in resealable aluminium foil.
- **Sample Dilution Buffer:**
1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Stop Solution:**
1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):**
1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:**
1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled Protein A/G; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **TMB Substrate Solution:**
1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:**
1 vial containing 2 mL; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:**
1 vial containing 3 mL; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Negative Control:**
1 vial containing 2 mL; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2 Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3 Materials and Equipment needed

- ELISA microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37° C
- Manual or automatic equipment for rinsing microtiterplate wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5 STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2 °C - 8 °C.

The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2 °C - 8 °C.

6 REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20 °C - 25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1 Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with Brucella antigens.

Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2 °C - 8 °C.

6.2 Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer **1 + 19**; e. g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water.

The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20 °C - 25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3 TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2 °C - 8 °C, away from the light.

The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7 SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use serum or milk samples with this assay.

- Serum: Use bovine or porcine serum samples with this assay.
- Pooled serum: Use of up to five pooled samples. A maximum of five samples can be pooled.
- Milk: Use bovine milk samples with this assay.
Whole-milk samples can be used after centrifugation for 15 minutes at 2000×g or 2 minutes at 10.000×g.
The sample should be drawn from below the cream layer.

Avoid repeated freezing and thawing.

Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1 Sample Dilution

Before assaying all **serum samples** should be diluted **1 + 100** with **Sample Dilution Buffer**.

Dispense 10 µL sample and 1 mL Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1 + 100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

Pooled serum samples should be **diluted** with **Sample Dilution Buffer**.

Dispense e.g. 10 µL of each sample (up to 5 samples) together in 1 mL Sample Dilution Buffer into one tube and thoroughly mix with a Vortex.

Before assaying all **milk samples** should be diluted **1+10** with **Sample Dilution Buffer**.

Dispense 100 µL milk and 1 mL Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+10 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

Optimal milk dilution might differ from region to region and between animal species.

It may range from undiluted to 1+20 and has to be determined by each lab by itself. The described 1+10 dilution has to be considered as a starting point for evaluation.

8 ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 μ L to 350 μ L to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 °C \pm 1 °C.

1. Dispense 100 μ L standards/controls and diluted samples into their respective wells.
Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at 37 \pm 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 μ L of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 μ L Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20 °C - 25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 μ L TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 °C - 25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 μ L Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1 Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9 RESULTS

9.1 Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **0.200 and < Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2 Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43

Cut-off = 0.43

9.2.1 Results in Units [DU]

$$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{DRG Units} = \text{DU}]$$

Example:
$$\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ DU}$$

9.3 Interpretation of Results

Normal value ranges for this ELISA should be established by each laboratory based on its own sample populations in the geographical areas serviced.

The following values should be considered as a guideline:

Cut-off	10 DU	-
Positive	> 11 DU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 DU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 DU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.		

10 SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

The performance data have been established with selected serum samples. Due to the nature of the Protein A/G conjugate this ELISA should react with other mammalian species also. More detailed information is available on request.

10.1 Precision

Intra assay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	0.577	4.14
#2	24	1.276	3.34
#3	24	1.200	2.75
Inter assay	n	Mean (DU)	CV (%)
#1	12	23.22	4.97
#2	12	20.13	6.05
#3	12	5.10	8.55

10.2 Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.

Diagnostic Specificity (bovine and porcine): > 98 % (95 % confidence interval: 88.78 % - 98.62 %)

10.3 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

Diagnostic Sensitivity (bovine and porcine): > 98 % (95 % confidence interval: 63.37 % - 98.62 %)

10.4 Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

10.5 Cross Reactivity

Cross reactions cannot be excluded.

11 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12 PRECAUTIONS AND WARNINGS

- Only for veterinary in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

12.1 Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

 Warning	H317	May cause an allergic skin reaction.
	P261	Avoid breathing spray
	P280	Wear protective gloves/protective clothing.
	P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
	P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
	P362+P364	Take off contaminated and wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2 Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

1 INTRODUCCIÓN

Especies de Brucella son muy pequeñas, Son bacterias gram-negativas inmóviles (0.4 - 0.8 µm de diámetro 0.4 - 3.0 µm de longitud). Ellas fueron nombradas después de que el médico militar Inglés Bruce Davis, aisló el patógeno en 1887 en Malta del bazo de un soldado fallecido con fiebre ondulante.

Especialmente después de cuatro especies son de importancia:

Brucella abortus:	agente causal de la brucelosis bovina
Brucella melitensis:	agente causal de la brucelosis ovina y caprina
Brucella suis:	agente causal de la brucelosis porcina
Brucella canis:	agente causal de la brucelosis canina

Los síntomas de la enfermedad son similares en ganado vacuno, ovejas, cabras y cerdos. Las ovejas parecen ser menos susceptibles se ha observado menos frecuencia de aborto en esta especie.

Después de la infección, la brucelosis comienza con una fase clínicamente normal que es a menudo inadvertida. Más tarde, a menudo hay inflamación de las articulaciones, y algunas veces la mastitis. Los principales síntomas de la brucelosis son abortos, nacimientos prematuros y nacimiento de crías muertas o débiles.

Por otro lado los toros infectados pueden desarrollar orquitis y epididimitis.

El patógeno se transmite principalmente por ingestión y en el apareamiento. La infección por la leche, la orina y las heces también es posible. La brucelosis en el ganado puede convertirse en una epidemia.

La brucelosis es una enfermedad que puede transmitirse a los seres humanos (zoonosis). Las personas en riesgo son especialmente pastores, agricultores, criadores de animales, veterinarios y personal de laboratorio.

Las infecciones pueden ser diagnosticadas:

- PCR específica por género
- Serología: Detección de anticuerpos por ELISA

2 USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima de DRG VetLine Brucella ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos contra Brucella en suero de veterinario, muestras del pool de suero y muestras de leche.

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unido, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo substrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA.

4 MATERIALES

4.1 Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:**
12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Brucella, en bolsa de aluminio.
- **Tampón de Dilución de Muestras:**
1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH $7,2 \pm 0,2$; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Solución de Parada:**
1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Tampón de Lavado (20x conc.):**
1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH $7,2 \pm 0,2$; tapa blanca.
- **Conjugado:**
1 botella de 20 mL Proteína A/G conjugada con peroxidasa de rábano (HRP); color amarillo; tapa blanca; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Solución de Sustrato de TMB:**
1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), $< 0,1 \%$; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control Positivo:**
1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Control Cut-off:**
1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Control Negativo:**
1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/MIT (3:1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 12.1.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2 Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3 Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Dispositivo de lavado manual o automático para Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10-1000 μ L)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5 ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2 °C - 8 °C.

Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2 °C - 8 °C.

6 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras para a la temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

6.1 Placa de Microtitulación

As tiras rompibles están recubiertas con antígenos del Brucella.

Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita di dióxido de silicio y almacenar a 2 °C - 8 °C.

6.2 Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir la Tampón de Lavado **1+19**; por ejemplo 10 mL de la Tampón de Lavado + 190 mL de agua destilada.

La Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente o a 2 °C - 8 °C. Caso aparecen cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

6.3 Solución de Sustrato de TMB

La solución está listo para su uso y debe almacenarse a 2 °C - 8 °C, protegida de la luz.

La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizada en el ensayo.

7 TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o leche para este ensayo.

- Suero: Usar muestras de suero bovino o porcino.
- Pool de suero: Usar hasta 5 muestras agrupadas. Se puede hacer un pool de sueros máximo con cinco muestras.
- Leche: Usar muestras de leche bovino.

Las muestras de leche completas pueden ser usadas después de 15 minutos de centrifugación a 2000 x g o por 2 minutos a 10000 x g. La muestra debe extraer debajo de la capa de nata.

Evitar congelar y descongelar las muestras repetidamente.

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1 Dilución de las muestras

Antes de ejecutar el ensayo, todas las **muestras de suero** deben ser diluidas **1+100** con el **Tampón de Dilución de Muestras**.

P.ej. dispensar 10 µL de muestra y 1 mL de Tampón de Dilución de Muestras en un tubo y mezclar bien con vórtex.

Las **muestras sueros combinados (pool)** deben ser **diluidas** con el **Tampón de Dilución de Muestras**:

Por ejemplo, dispensar en un tubo 1 mL de Tampón de Dilución de Muestras y 10 µL de cada muestra (máximo 5 muestras) y mezclar bien con vórtex.

Todas las **muestras de leche** deben ser diluidas **1+10** con el **Tampón de Dilución de Muestras**, antes de ejecutar el ensayo.

P.ej. dispensar 100 µL de muestra y 1 mL de Tampón de Dilución de Muestras en un tubo y mezclar bien con vórtex.

La dilución ideal de la leche puede diferir de una región a región y entre especies animales. Puede variar desde muestras sin diluir hasta muestras con diluciones 1+20 y debe ser determinado individualmente por cada laboratorio. La dilución 1+10 descrita debe considerarse como punto de partida para la evaluación.

8 PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavado de tres hasta cinco veces y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble) en lo esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pozos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos.
Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h \pm 5 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL de la Tampón de Lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetar 100 µL de Conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20°C - 25°C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100 µL de la Solución de Sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20°C - 25°C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la Solución de Parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con la Solución de Sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la Solución de Parada.

8.1 Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA **al cero** utilizando **el Blanco**.

Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se pueren ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de esto debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en la **esquema de la placa**.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9 CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1 Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < **0,100**
- **Control negativo:** valor de la extinción < **0,200 y < Cut-off**
- **Control cut-off:** valor de la extinción **0,150 – 1,300**
- **Control positivo:** valor de la extinción > **Cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2 Calculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de lo Control cut-off.

Ejemplo: $0,42 \text{ OD Control cut-off} + 0,44 \text{ OD Control cut-off} = 0,86/2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

9.2.1 Resultados en unidades [DU]

$\frac{\text{Promedio valor de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{DRG-unidades} = \text{DU}]$

Ejemplo: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ DU}$

9.3 Interpretación de los resultados

Los intervalos de valores normales para el ELISA deben ser establecidos por cada laboratorio con base en las muestras de la propia población en las áreas geográficas atendidas.

Estos son los datos normativos:

Cut-off	10 DU	-
Positivo	> 11 DU	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 DU	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como negativa .
Negativo	< 9 DU	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.
El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología junto al resultado serológico.		

10 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en lo grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

Los datos de rendimiento se han determinado con muestras de suero seleccionadas. Debido a las propiedades del conjugado proteína A/G, el ELISA debe reaccionar con las muestras de todos mamíferos.

Información más detallada está disponible bajo petición.

10.1.1 Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	0.577	4.14
#2	24	1.276	3.34
#3	24	1.200	2.75

Inter ensayo	n	Promedio (DU)	CV (%)
#1	12	23.22	4.97
#2	12	20.13	6.05
#3	12	5.10	8.55

10.2 Especificidad Diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico.

Especificidad diagnóstica (bovino y porcino): > 98 % (95% Intervalo de confianza: 88.78 % - 98.62 %)

10.3 Sensibilidad de Diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico.

Sensibilidad de diagnóstico (bovino y porcino): > 98 % (95% Intervalo de confianza: 63.37 % - 98.62 %)

10.4 Interferencias

Las muestras lipémicas, ictericas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/mL para triglicéridos, de 0,5 mg/mL para bilirrubina y de 10 mg/mL hemoglobina.

10.5 Reacción cruzada

Las reacciones cruzadas no pueden ser excluidas.

11 LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

12 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Solo para diagnósticos veterinarios in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

12.1 Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.



Atención

H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
261	Evitar respirar el aerosol.
P280	Llevar guantes/prendas.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

12.2 Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13 BIBLIOGRAPHY BIBLIOGRAFÍA

1. Wundt W. Krankheiten durch Brucellen. In: Gsell O. und Mohr W. Infektionskrankheiten. Springer Verlag Berlin Heidelberg (1968).
2. Godfroid J. Brucellosis in wildlife. Rev Sci Tech. 2002 Aug;21(2):277-86.
3. Salata, R.A., Ravdin, J.I. (1985) Brucella species (Brucellosis). In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, EDS. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: John Wiley, 1283-90
4. Ariza, J., Pellicer, T., Pallarés, R., Foz, A. and Gudiol, F. (1992) Specific antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis. 1992 Jan;14(1):131-40.
5. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin Microbiol Rev. 2001 Jan;14(1):177-207.
6. Gad El-Rab MO, Kambal AM. Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. J Infect. 1998 Mar;36(2):197-201.
7. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis. 1997 Apr-Jun;3(2):213-21.

Abbreviations / Abreviaciones

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Symbols used

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
IVD	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
LOT	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
VET	For veterinary in vitro diagnostic use only				
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité
MTP	Microplate	Mikrotiterplatte	Micropiastra	Microplaca	Microplaque
CONJL	Conjugate	Konjugat	Coniugato	Conjugado	Conjugué
CONTROL -	Negative Control	Negativkontrolle	Controllo negativo	Control positivo	Contrôle négatif
CONTROL +	Positive Control	Positivkontrolle	Controllo positivo	Control positivo	Contrôle positif
CUT OFF	Cut off control	Cut off-Kontrolle	Controllo cut-off	Control cut-off	Contrôle cut-off
CAL	Standard or Calibrator	Standard oder Kalibrator	Standard o Calibratore	Estándar o Calibrador	Standard o Etalon
DIL	Sample Diluent	Probenverdünnungspuffer	Tampone diluente	Diluyente de la muestra	Diluant pour échantillon
SOLN STOP	Stop solution	Stopplösung	Soluzione bloccante	Solución de parada	Solution d'arrêt
SUB TMB	TMB Substrate solution	TMB-Substratlösung	Soluzione substrato TMB	Solución de sustrato de TMB	Solution de substrat TMB
WASH BUF 20x	Washing Buffer 20x concentrated	Waschpuffer 20x konzentriert	Tampone di lavaggio concentrazione x20	Tampón de lavado concentrado x20	Tampon de lavage concentré 20 x