

VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Bovinos



Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti Brucella abortus en muestras de suero o leche bovina.

Indirect ELISA kit for the detection of anti Brucella abortus antibodies in bovine serum or milk.


Solo autorizada su venta a laboratorios inscriptos en la Red Nacional del SENASA.



Elisa



Bovino

 Chemtest S.A.
Av. 25 de Mayo 1021, San Martín (C.P. 1650), Buenos Aires, Argentina.
info@chemtest.net - chemtest.net

VETLIS®
Brucella Glyco-iELISA Bovinos (suero/leche)

Contenido

| | | |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|
| <i>Microplaca de análisis</i> | Microplacas de 96 pocillos recubiertas con el antígeno, selladas y almacenadas en seco | 2 Microplacas (192 determinaciones) |
| <i>Conjugado</i> | Liofilizado (anticuerpos anti-IgG bovina conjugados con peroxidasa de rábano) | 2 unidades |
| <i>Solución sustrato-cromógeno</i> | Lista para usar [3,3',5,5'-Tetrametilbencidina en solución de sustrato con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)] – CONSERVAR EN OSCURIDAD | 1 x 30 ml |
| <i>Solución de frenado</i> | Lista para usar (contiene ácido clorhídrico 1%) - CORROSIVO | 1 x 30 ml |
| <i>Solución de lavado</i> | Concentrada 10X | 1 x 120 ml, 10X (c.s.p. 1,2 litros) |
| <i>Control positivo</i> | Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timersal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%] | 1 x 0,1 ml |
| <i>Control negativo</i> | Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timersal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%] | 1 x 0,1 ml |
| <i>Manual de instrucciones</i> | | 1 |

Nombre y aplicación

VETLIS®

Brucella Glyco-iELISA Bovinos (suero/leche)

Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti *Brucella abortus* en muestras de suero o leche bovina.

El kit VETLIS® *Brucella Glyco-iELISA Bovinos* es un kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto para la detección de anticuerpos específicos contra el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella abortus* en muestras de suero y/o leche bovina. El kit posee un excelente desempeño diagnóstico, minimiza las reacciones cruzadas con otras bacterias Gram-negativas y es el primer ELISA indirecto que permite diferenciar animales naturalmente infectados de aquellos vacunados con la cepa vacunal S19.

Introducción

La brucelosis es una zoonosis altamente contagiosa causada por bacterias Gram-negativas del género *Brucella*. La especie *Brucella abortus* es el agente causal de la brucelosis del ganado bovino. Esta enfermedad produce, en las hembras preñadas, abortos en períodos avanzados de gestación, infertilidad, retención placentaria, nacimientos prematuros y disminución de la producción láctea. En los machos la infección puede producir infertilidad, epididimitis y orquitis. Adicionalmente, la detección de la enfermedad en una región o país impone restricciones al movimiento y comercialización del ganado. Por estas razones, la brucelosis bovina causa grandes pérdidas económicas y, por lo tanto, se debe monitorear el ganado para detectar la infección.

Debido al alto impacto económico de la enfermedad en la producción y sanidad animal y al riesgo de transmisión a la población humana, la mayoría de los países

han implementado programas para el control y/o erradicación de la brucelosis en el ganado. La brucelosis en humanos puede ser debilitante e incapacitante y constituye un importante problema de salud pública. En ausencia de una vacuna contra la brucelosis humana, la prevención de la enfermedad depende principalmente del control de la brucelosis en los animales que constituyen el reservorio natural de la enfermedad.

En particular, el control de la brucelosis bovina depende de la vacunación, principalmente con la cepa vacunal S19, como así también de la detección y sacrificio de los animales infectados.

El diagnóstico confirmatorio de brucelosis se realiza en forma directa mediante el aislamiento del microorganismo a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos. Sin embargo, debido al crecimiento lento de *Brucella* a partir de cultivos primarios (hasta 7 días), el riesgo involucrado en su manejo y la baja sensibilidad del aislamiento bacteriológico determinan que el diagnóstico basado exclusivamente en el aislamiento de *Brucella* no siempre sea factible y eficaz. Por este motivo el diagnóstico de laboratorio de brucelosis bovina se basa principalmente en el diagnóstico serológico mediante la detección de anticuerpos específicos contra el agente infeccioso en muestras de suero y/o leche. En este sentido, es fundamental que el método serológico utilizado permita discriminar claramente los animales que han sido vacunados de aquellos naturalmente infectados, y de esta manera evitar el sacrificio innecesario de animales vacunados.

Principio de la técnica

El kit VETLIS® *Brucella Glyco-iELISA Bovinos* es el primer enzoinmunoensayo indirecto en fase sólida basado exclusivamente en la detección de anticuerpos IgG anti-polisacárido O de *Brucella*. Un resultado positivo en el *Brucella Glyco-iELISA Bovinos* indica la presencia de anticuerpos anti-polisacárido O. Estos

anticuerpos constituyen un excelente marcador específico de infección brucélica, lo que permite confirmar el diagnóstico de la infección eliminando el riesgo de reacciones falso-positivas debido a reacciones cruzadas por la presencia de anticuerpos dirigidos contra epítomos comunes presentes en el lípido A y el core oligosacárido del LPS de otras bacterias. Además, minimiza las reacciones falso-positivas debido a la presencia de anticuerpos residuales producidos en respuesta a la vacunación con S19. Sin embargo, muestras obtenidas antes de los 6 meses post-vacunación con S19 podrían resultar reactivas. Por lo tanto, para los animales vacunados con S19 se recomienda analizar muestras obtenidas después de los 6 meses post-vacunación. En este ensayo las muestras de suero o leche bovina son expuestas a pocillos recubiertos con el antígeno (glicoproteína recombinante purificada) de Brucella. Si la muestra contiene anticuerpos anti-polisacárido O de Brucella abortus, estos se unen al antígeno del pocillo. Al añadir el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP), se forma un complejo con los anticuerpos IgG unidos al pocillo. El material libre es eliminado mediante lavados antes de agregar la solución sustrato-cromógeno. El color azul que aparece es el producto de la reacción del sustrato-cromógeno con el conjugado en aquellas muestras que resulten positivas. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra que reaccionan con el antígeno. Cuanto mayor es el título de anticuerpos presentes en la muestra, más intenso es el desarrollo de color en los pocillos de ensayo. La reacción se detiene mediante el agregado de la solución de frenado y se observa un cambio de color al amarillo. La lectura de los resultados se realiza en un espectrofotómetro de microplacas midiendo la absorbancia (Abs) a 450 nm.

Componentes del kit

-Microplaca de análisis

Microplacas de 96 pocillos recubiertas con el antígeno, selladas y almacenadas en seco.

-Solución de lavado

Concentrada 10X.

-Conjugado

Liofilizado (anticuerpos anti-IgG bovina conjugados con peroxidasa de rábano).

-Solución sustrato-cromógeno

Lista para usar [3,3',5,5'-Tetrametilbencidina en solución de sustrato con peróxido de hidrógeno (H_2O_2)] – CONSERVAR EN OSCURIDAD.

-Solución de frenado

Lista para usar (contiene ácido clorhídrico 1%) - CORROSIVO.

-Control positivo

Suero – CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0,01%].

-Control negativo

Suero – CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0,01%].

-Manual de instrucciones

Almacenamiento y vencimiento

Conservar a temperatura entre 2 y 8°C. Temperatura de transporte: 4 a 15°C hasta 72 horas. La conservación correcta de todos los componentes del kit permitirá el uso del mismo hasta la fecha de caducidad.

Vencimiento: 12 meses. No utilizar componentes de diferentes lotes o después de la fecha de vencimiento.

Materiales necesarios que no se suministran

-Pipeta multicanal y micropipetas (10, 100 y 1000 μ l) de alta precisión.

-Contenedores para pipeta multicanal.

-Puntas de pipetas desechables.

-Lector de microplacas capaz de medir la absorbancia (Abs) a 450 nm.

-Agitador orbital.

-Cronómetro.

-Tubos para la dilución de los controles y muestras.

-Recipiente de 1 litro para preparación de solución de lavado.

-Agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo

l). Debe ser de la mayor calidad posible.
-Cobertor para microplacas (tapa, papel aluminio o film adhesivo).

Precauciones de uso

1. Leer atentamente y seguir todas las instrucciones de uso ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el manual de instrucciones incluido en el kit.
2. Conservar el kit y todos sus componentes a 2-8°C.
3. Antes de usar dejar que todos los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente (20-25°C), y colocar nuevamente a 2-8°C inmediatamente después de su uso.
4. Manipular todos los reactivos siguiendo la Buenas Prácticas de Laboratorio.
5. Las muestras de suero y leche, como así también los controles positivo y negativo, deben considerarse potencialmente infecciosas y, por lo tanto, estas y los componentes del kit que las contactan deben manipularse con guantes y descartarse como residuo patológico según normativa legal vigente. La Solución de frenado contiene ácido clorhídrico (corrosivo). Su contacto con la piel genera irritación y debe manipularse con guantes. El resto de los componentes del kit no representa ningún riesgo potencial para la salud y el medio ambiente.
6. No usar el kit pasada la fecha de caducidad o si los componentes no fueron conservados en las condiciones indicadas arriba.
7. No mezclar componentes o manuales de instrucciones de kits de distintos lotes.
8. Manipule los componentes del kit con cuidado para evitar la contaminación de los mismos.
9. Si se reutilizan los contenedores para pipeta multicanal, los mismos deben ser lavados de forma exhaustiva con agua de alta calidad e identificados para ser reutilizados con la misma solución.
10. Usar puntas de pipetas distintas para cada reactivo y para cada muestra.

11. Incluir los controles positivo y negativo, y el blanco de muestra al menos por duplicado en cada serie de análisis.

12. Para la reconstitución de los reactivos usar solamente agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I).

Preparación de reactivos para una microplaca de análisis (96 reacciones)

a. Solución de lavado 1X

Preparar 400 ml de Solución de lavado 1X (suficiente para un microplaca) agregando 40 ml de Solución de lavado 10X a 360 ml de agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I). Mezclar muy bien antes de usar. Una vez preparada, la Solución de lavado 1X se puede conservar a 2-8°C durante 7 días.

Nota: si se observaran cristales en la Solución de lavado 10X, la botella debe calentarse a no más de 45°C y agitar muy bien hasta la completa disolución de los mismos.

b. Conjugado

Reconstituir el Conjugado liofilizado añadiendo 10 ml (por frasco) de la Solución de lavado 1X preparada previamente (ver ítem anterior). Añadir la solución de lavado cuidadosamente. Dejar reposar el frasco un minuto y mezclar muy bien (tapar el frasco y homogenizar una o dos mediante agitación cabeza-cola). Preparar antes de usar.

El conjugado una vez reconstituido se puede conservar a -20°C por un tiempo máximo de 14 días (no puede ser almacenado en el refrigerador) y durante este período sólo se puede congelar y descongelar una vez.

Preparación de los controles para una microplaca de análisis (96 reacciones)

a. Control positivo y control negativo

En tubos de 1,5 ml agregar 10 µl de cada control a 1000 µl de Solución de lavado 1X (dilución 1:100). Mezclar bien antes de usar. En cada microplaca los controles positivo y negativo se agregan al menos por duplicado (100 µl por pocillo).

Nota: los controles positivo y negativo provistos se utilizan para procesar indistintamente las muestras de suero o leche.

b. Blanco de muestra

En cada placa se debe agregar un blanco de muestra constituido por la Solución de lavado 1X. Dispensar directamente, y por duplicado, 100 µl por pocillo de Solución de lavado 1X.

Preparación de las muestras

a. Muestras de suero

Las muestras de suero deben diluirse 1:100 utilizando la Solución de lavado 1X. Para ello, agregar 10 µl de suero a 1000 µl de Solución de lavado 1X. Se utilizan 100 µl de muestra diluida por pocillo.

Nota: pueden analizarse sueros frescos, refrigerados o congelados, libres de turbidez. Las muestras se pueden guardar en heladera durante 1 ó 2 días. Para una conservación más prolongada, las muestras se deben guardar a -20°C y, en estos casos, se deben descongelar totalmente, llevar a temperatura ambiente y homogeneizar antes de realizar el análisis.

b. Muestras de leche

Las muestras de leche individual o de pool de muestras (tanque) se procesan sin diluir. Se utilizan 100 µl de muestra por pocillo.

Se debe usar siempre leche fresca recién obtenida o conservada en refrigerador por un período no mayor a 5 días. Si se utilizan muestras que fueron almacenadas en el refrigerador durante el período establecido, previo al análisis llevar las muestras a temperatura ambiente y homogeneizar suavemente.

Notas: Las muestras de leche se pueden analizar en forma individual o en mezcla proveniente de tanque.

En caso de observar una variabilidad entre los duplicados mayor al 20%, se recomienda repetir el ensayo centrifugando las muestras a 10.000 x g durante 2 min y tomar 100 µl de muestra introduciendo la punta de la micropipeta por debajo de la capa de grasa superior.

Notas generales: Las muestras (suero, leche individual, pool de leches) se pueden analizar en un solo pocillo. Sin embargo, se recomienda analizar las muestras al menos por duplicado.

Las muestras contaminadas y/o en mal estado pueden producir resultados erróneos.

Instrucciones de uso para una micro-

placa de análisis (96 reacciones)

1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-25°C). No retirar la placa de su envoltorio hasta que la misma haya alcanzado la temperatura ambiente.

2. Agregar por duplicado 100 µl por pocillo del control positivo, control negativo y blanco de muestra. Ver ítem Preparación de los controles.

3. Agregar 100 µl por pocillo de cada muestra de suero o leche. Ver ítem Preparación de las muestras.

Nota: las muestras se pueden procesar en un solo pocillo o por duplicado. Sin embargo, para obtener un resultado más confiable se recomienda procesar las muestras al menos por duplicado.

4. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

5. Lavar 4 veces con 200 a 300 µl de Solución de lavado 1X por pocillo. Ver ítem Preparación de reactivos.

Nota: Retirar el líquido completamente después de cada lavado por volcado y golpeando la placa sobre material absorbente o aspiración con pipeta. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de agregar el reactivo siguiente.

6. Agregar 100 µl de Conjugado a cada pocillo. Ver ítem Preparación del conjugado. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

7. Repetir el paso 5.

8. Agregar 100 µl de Solución sustrato-cromógeno en cada pocillo e incubar con agitación orbital suave durante 10 minutos (±1 minuto) a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad (por ejemplo, cubrir la placa con papel aluminio). Comenzar a contar el tiempo luego de llenar el primer pocillo.

9. Detener la reacción agregando 100 µl de Solución de frenado en cada pocillo y mezclar cuidadosamente aplicando ligeros golpes en los bordes de la placa.

La Solución de frenado debe agregarse en el mismo orden y velocidad que la Solución sustrato-cromógeno (ver paso 8).

10. Medir la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas. No es necesario realizar una lectura de blanco. Realizar la lectura dentro de los 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

Nota: muestras con altos valores de reactividad pueden dar lugar a la aparición de un precipitado del color negro debido a la precipitación del sustrato.

Cálculos

Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de reactividad (PR) con respecto al control positivo incluido en cada ensayo. Los valores de absorbancia medidos a 450 nm (Abs450) de cada muestra y del control negativo (CN) se relacionan con el valor de Abs450 del control positivo (CP) de la siguiente forma:

$$PR_{CN} = \frac{\text{Promedio Abs}_{450} \text{ CN}}{\text{Promedio Abs}_{450} \text{ CP}} \times 100$$

$$PR_{MUESTRA} = \frac{\text{Abs}_{450} \text{ Muestra}^*}{\text{Promedio Abs}_{450} \text{ CP}} \times 100$$

*Abs450 promedio en caso de procesar las muestras por duplicado.

Criterios de validez de la prueba

Para confirmar la validez del ensayo deben cumplirse los siguientes criterios:

- El valor del promedio de Abs450 del CP debe ser mayor a 1,2 (Promedio Abs450 CP > 1,2).
- Los valores de Abs450 de los duplicados de los controles (CP y CN) y las muestras no deben diferir en más del 20% con respecto al promedio del duplicado.
- Los valores de Abs450 del Blanco de muestra (Blc Mtra) deben ser inferiores

a 0,1 (Abs450 Blc Mtra < 0,1).

- El valor promedio de la Abs450 del CN debe ser menor a 0,15 (Promedio Abs450 CN < 0,15).
- La relación Promedio Abs450 CP / Promedio Abs450 CN debe ser mayor a 8 (Promedio Abs450 CP / Promedio Abs450 CN > 8).

Si no se cumple alguno de estos criterios, la prueba no se puede considerar válida. En este caso la prueba debe repetirse ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el manual de instrucciones incluido en el kit.

Interpretación de los resultados

Los resultados de las muestras deben interpretarse de la siguiente manera:

Suero (dilución 1:100)

| PR | Interpretación |
|---------------|----------------|
| ≤ 11% | Negativo |
| > 11% a < 20% | Dudoso |
| ≥ 20% | Positivo |

Leche (sin diluir)

| PR | Interpretación |
|---------------|----------------|
| ≤ 10% | Negativo |
| > 10% a < 12% | Dudoso |
| ≥ 12% | Positivo |

En caso de obtener un resultado dudoso la prueba se debe repetir. Si el resultado es todavía dudoso, se recomienda ensayar una segunda muestra del animal obtenida después de un período de, por lo menos, 3 semanas. Si con la nueva muestra se obtiene nuevamente un resultado dudoso, debería contemplarse la situación epidemiológica y analizar la muestra con otra técnica si esto fuera posible.

Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Para determinar la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) diagnóstica del ensayo, se analizaron un total de 774 muestras

de suero y 302 muestras de leche obtenidas de animales vacunados con la cepa S19 y provenientes de establecimientos libres de brucelosis (muestras negativas) y de animales positivos (muestras positivas). El grupo de muestras negativas incluye muestras serológicamente negativas para todas las pruebas (BPAT, CELISA, FPA y CFT*) como así también muestras positivas por BPAT pero negativas para el resto de las pruebas (CELISA, FPA y CFT).

A partir de los resultados obtenidos con estas muestras se realizó un ensayo por curvas ROC (receiver-operating-analysis). Este análisis permitió determinar para los distintos tipos de muestra el valor de corte que maximiza simultáneamente la Se y Sp, el valor de corte para el cual la Se es 100% y el punto de corte para alcanzar una Sp del 100%.

*BPAT, ensayo de aglutinación en placa; CELISA, ELISA competitivo; FPA, ensayo de polarización de fluorescencia; CFT, ensayo de fijación de complemento.

Tabla 1

Sensibilidad, especificidad e índice de Youden del ensayo para distintos valores de corte.

| Glyco-IELISA | Valor de corte (PR) | Se (%) ^b | Sp (%) ^b | J ^c |
|--------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| Suero | | | | |
| | > 11,0 | 100 (95,0-100) | 98,6 (95,9-99,7) | 0,986 |
| | > 20,0 | 97,2 (90,3-99,7) | 100 (98,2-100) | 0,972 |
| Leche | | | | |
| | > 10,0 | 100 (96,1-100) | 99,0 (96,5-99,9) | 0,990 |
| | > 12,0 | 95,7 (89,5-98,8) | 100 (98,2-100) | 0,957 |

(a) PR, porcentaje de reactividad.

(b) Se, sensibilidad (TP/TP+FN) x100; Sp, especificidad (TN/TN+FP) x100. Los valores entre paréntesis indican el intervalo de 95% de confianza. TP, positivo verdadero; TN, negativo verdadero; FP, falso positivo; FN, false negativo.

(c) J, índice de Youden (Se+Sp-1).

Referencias

-Ciocchini, AE; Rey Serantes, DA; Melli, LJ; Guidolin, LS; Iwashkiw, J; Elena, S; Franco, C; Nicola, AM; Feldman, MF; Comerci, DJ and Ugalde, JE. A bacterial engineered glycoprotein as a novel antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, Aug. 2014, 27; 172(3-4):455-65.

-Iwashkiw, J., Fentabil, M., Faridmoayer, A., Mills, D.C., Peppler, M. Czubener, C., Ciocchini, A.E., Comerci, D.J., Ugalde, J.E. and Feldman, M.F. Exploiting the *Campylobacter jejuni* protein glycosylation system for glycoengineering vaccines and diagnostic tools directed against brucellosis. *Microbial Cell Factories* 2012 Jan 25;11-13.

VETLIS®
Brucella Glyco-iELISA Bovines (serum/milk)

Kit components

| | | |
|--------------------------------------|--|---|
| <i>Microplate</i> | 96-well microtitre plate coated with the antigen, sealed and stored dry | 2 microplates (192 tests) |
| <i>Conjugate</i> | Lyophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG antibodies) | 2 units |
| <i>Substrate-chromogen solution</i> | Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)]- STORE IN THE DARK | 1 x 30 ml |
| <i>Stop solution</i> | Ready to use (contains HCl 1%) – CORROSIVE | 1 x 30 ml |
| <i>Wash solution</i> | 10X concentrate | 1 x 120 ml, 10X (sufficient for 1.2 liters) |
| <i>Bovine Positive Control Serum</i> | Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%] | 1 x 0.1 ml |
| <i>Bovine Negative Control Serum</i> | Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%] | 1 x 0.1 ml |
| <i>Instruction manual</i> | | 1 |

Name and application

VETLIS®

**Brucella Glyco-iELISA Bovines (serum/
milk)**

Indirect ELISA kit for the detection of anti *Brucella abortus* antibodies in bovine serum or milk.

The kit **VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Bovines** is an ELISA kit (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) for the indirect detection of specific antibodies against the O polysaccharide of the lipopolysaccharide (LPS) of *Brucella abortus* in bovine serum or milk. The kit has an excellent diagnostic performance, minimizes cross-reaction with other Gram-negative bacteria and is the first indirect ELISA that allows to differentiate naturally infected animals from those vaccinated with the vaccine strain S19.

Introduction

Brucellosis is a highly contagious zoonotic disease caused by Gram-negative bacteria of the genus *Brucella*. The species *Brucella abortus* is the causative agent of brucellosis in cattle. This disease causes abortions in advanced gestation periods in pregnant females, infertility, placental retention, premature births and decreased milk production. In males, the infection can cause infertility, epididymitis and orchitis. Additionally, detection of the disease in a region or country imposes restrictions on the movement and sale of livestock. For these reasons, bovine brucellosis causes great economic losses and, therefore, should be monitored in herds to detect infection. Due to the high economic impact of the disease in animal production and health and to the risk of transmission to humans, most countries have implemented programs to control and/or eradicate brucellosis in cattle. Brucellosis in humans can be debilitating and disabling and is an important public health problem. In the

absence of a vaccine against human brucellosis, disease prevention depends primarily on the control of brucellosis in animals, the natural reservoir of the disease. In particular, the control of bovine brucellosis depends primarily on the vaccination with vaccine strain S19, in combination with the detection and slaughter of infected animals. The confirmatory diagnosis of brucellosis is performed directly by isolating the organism from blood cultures, bone marrow or other tissues. However, due to the slow growth of *Brucella* in primary cultures (up to 7 days), the risk involved in manipulating the bacteria and low sensitivity of its isolation, determined that the isolation of *Brucella* for diagnosis is not always feasible and effective. For this reason, the **laboratory diagnosis of bovine brucellosis is mainly based on the detection of specific antibodies against the infectious agent in serum and/or milk samples**. In this sense, it is essential that the serological method used allows discrimination of vaccinated from naturally infected animals, and thus avoid unnecessary slaughter of healthy animals.

Principles of the technique

The VETLIS® **Brucella Glyco-iELISA Bovines** kit is the first indirect solid phase enzyme immunoassay based exclusively on the detection of *Brucella* anti-O polysaccharide IgG antibodies. A positive result by *Brucella* Glyco-iELISA Bovines indicates the presence of anti-O polysaccharide antibodies. These antibodies are an excellent specific marker of brucellosis infection, which can confirm the diagnosis of infection by eliminating the risk of false-positive cross-reactions due to the presence of antibodies directed against common epitopes present in the lipid A and the core of the LPS from other bacteria. In addition, false positive reactions due to the presence of residual antibodies produced in response to vaccination with S19 are minimized. However,

in some cases samples obtained before 6 months post-vaccination with the strain S19 strain may be reactive. Therefore, for animals vaccinated with S19 it is recommended to analyze samples obtained after 6 months post-vaccination.

In this assay, serum or milk samples are exposed to the wells coated with the Brucella antigen (purified recombinant glycoprotein). If the sample contains anti Brucella abortus O polysaccharide antibodies, they bind to the antigen in the well. Upon addition of the horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody, a complex is formed with the bovine IgG antibodies attached to the antigen in the well. Free antibodies are removed by washing before adding the substrate-chromogen solution. The blue color that appears is the product of the reaction of the substrate-chromogen with the conjugate in those samples that are positive. The color intensity is directly proportional to the amount of antibodies present in the sample reacting with the antigen. The higher the antibody titer present in the sample, the more intense color develops in the test wells. The reaction is stopped by adding the stop solution, upon which a color change to yellow is observed. The reading of the results is performed in a microplate spectrophotometer measuring the absorbance (Abs) at 450 nm.

Kit components

-Microplate

96-well microtitre plate coated with the antigen, sealed and stored dry.

-Wash solution

10X concentrate.

-Conjugate

Lyophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG antibodies).

-Substrate-chromogen solution

Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing hydrogen peroxide (H₂O₂)]- STORE IN THE

DARK.

-Stop solution

Ready to use (contains HCl 1%) – CORROSIVE.

-Bovine Positive Control Serum

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0.01%].

-Bovine Negative Control Serum

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0.01%].

-Instruction manual

Storage and expiration

Store at room temperature between 2 and 8°C. Transport temperature: 4 to 15°C for 72 hours. Proper storage of the kit and all reagents will allow the use until the expiration date.

Expiration: 12 months. Do not use reagents from different lots or after the expiration date.

Materials needed but not provided

-High precision multichannel pipette and micropipettes (10, 100 and 1000 µl).

-Containers for multichannel pipette.

-Disposable pipette tips.

-Microplate reader for absorbance determination at 450 nm.

-Orbital rotator.

-Timer.

-Tubes for the dilutions of the controls and samples.

-1 liter container for the preparation of the wash solution.

-Distilled (Type II) or ultrapure (Type I) water or any similar high quality water.

-Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive).

Precautions

1. Carefully read and strictly follow all instructions detailed in the instruction manual included in the kit.

2. Store the kit and all reagents at 2-8 °C.

3. All reagents should equilibrate at room temperature (20-25°C) before use and return to 2-8 °C following use.

4. Handle all materials and reagents according to the Good Laboratory Practices.

5. Serum and milk samples, as well as positive and negative controls, should be considered potentially infectious and, therefore, the kit components that contact them should be handled with gloves and disposed as pathological waste according to legal regulations. The stop solution contains hydrochloric acid (corrosive). Skin contact generates irritation and should be handled with gloves. The rest of the kit components does not represent any potential risk for health and the environment.

6. Do not use the kit beyond expiration date or if the kit components were not kept in the conditions indicated above.

7. Do not mix components or instruction manuals from different test kits batches.

8. Care should be taken to avoid contamination of kit components.

9. If multichannel pipette containers are reused, they should be washed thoroughly with high quality water for reuse and identified to be used with the same solution.

10. Use different pipettes tips for each reagent and for each sample.

11. Include positive and negative controls, and the blank sample in duplicate in each test.

12. For reconstitution of the reagents use only distilled (Type II) or ultrapure (Type I) water or high quality purified water.

Reagents preparation for one microplate (96 reactions)

a. Wash solution 1X

Prepare 400 ml of 1X Wash Solution (enough for a microplate) by adding 40 ml of 10X Wash Solution to 360 ml of distilled (Type II) or ultrapure (Type I) water. Mix well before using. Once prepared, the 1X Washing Solution can be stored at 2-8°C for 7 days.

Note: If crystals appear in the 10X Wash solution, the bottle must be heated not above 45°C

and shake well until completely dissolve.

b. Conjugate

Reconstitute the conjugate by adding 10 ml (per flask) of 1X Wash Solution previously prepared (see previous item). Add the Washing solution carefully. Allow to stand for a minute and mix well (cover the bottle and homogenize one or two by head-tail shaking). Prepare before use.

The reconstituted conjugate should be stored at -20°C (cannot be stored in the refrigerator) for not more than 14 days and during this period can be thaw and re-freeze just once.

Preparation of controls for one microplate (96 reactions)

a. Positive and negative controls

In tubes of 1.5 ml add 10 µl of each control to 1000 µl of 1X Wash Solution (1:100 dilution). Mix well before using. In each microplate positive and negative controls should be added at least in duplicate (100 µl per well).

Note: the positive and negative controls provided in the kit are used to process either serum or milk samples.

b. Blank sample

On each plate a blank sample consisting of 1X Wash Solution should be added. Dispense directly and in duplicate 100 µl per well of 1X Wash Solution.

Sample preparation

a. Serum samples

Serum samples should be diluted 1:100 using the 1X Wash Solution. Add 10 µl of serum to 1000 µl of 1X Wash Solution. Use 100 µl of diluted sample per well.

Note: fresh, chilled or frozen serum samples, free of turbidity, can be analyzed. Samples can be stored in refrigerator for 1 or 2 days. For longer periods store at -20°C and, in these cases, the samples should be completely thawed, bring to room temperature and homogenize before performing the analysis.

b. Milk samples

Individual milk samples or pool of samples (milk tank) are processed undiluted. 100 µl of sample are used per well.

Always use fresh milk or kept in the refrigerator for a period no longer than 5 days.

If samples were stored in the refrigerator, prior to analysis leave the samples until they reach room temperature and mix gently before use.

Notes: The milk samples can be analyzed individually or in a mixture from the milk tank. When a variability higher than 20% between duplicates is observed, it is recommended to repeat the test centrifuging the samples at 10,000 x g for 2 min and take 100 µl of sample inserting the tip of the micropipette below the top fat layer.

General Notes: Samples (serum, individual milk, milk pool) can be analyzed in a single well. However, it is recommended to analyze the samples at least in duplicate.

-Samples contaminated and/or not well conserved may produce erroneous results.

Instructions for the analysis of one microplate (96 reactions)

1. Allow the reagents equilibrate to room temperature (20-25°C). Do not remove the plate from its pouch until it has reached room temperature.

2. Add in duplicate 100 µl per well of the positive control, negative control and the blank sample. See Item Preparation of controls.

3. Add 100 µl per well of each serum or milk sample. See Item Sample preparation.

Note: samples can be processed in a single well or in duplicate. However, to obtain more reliable results it is recommended to run samples at least in duplicates.

4. Cover the plate and incubate at room temperature (20-25°C) with gentle orbital shaking for 1 hour.

5. Wash/rinse the plates 4 times with 200 to 300 µl of 1X Wash Solution per well. See item Reagents preparation.

Note: Remove the liquid completely after each washing by dump and tapping onto absorbent material or aspiration with pipette. Avoid plate

drying between plate washings and before adding the next reagent.

6. Add 100 µl of Conjugate to each well. See item Preparation of the conjugate. Cover the plate and incubate at room temperature (20-25°C) with gentle orbital shaking for 1 hour.

7. Repeat step 5.

8. Add 100 µl of Substrate-chromogen solution to each well, and incubated with gentle orbital shaking for 10 minutes (± 1 min) at room temperature (20-25°C) and in the dark (for example, cover the plate with aluminum foil). Start counting the time after filling the first well.

9. Stop the reaction by adding 100 µl of Stop solution into each well and mix thoroughly by lightly tapping the edges of the plate. This solution must be added in the same order and speed as the Substrate-chromogen solution (see Step 8).

10. Measure the absorbance at 450 nm using a plate spectrophotometer. There is no need to perform a blank reading. Perform the reading within 15 minutes after adding the stop solution.

Note: samples with high reactivity values can lead to the appearance of a black precipitate due to the precipitation of the substrate.

Calculations

Expression of results

Results are expressed as the percentage of reactivity (PR) with respect to the positive control included in each test. The absorbance values measured at 450 nm (Abs₄₅₀) of each sample and the negative control (NC) are related to the Abs₄₅₀ value of the positive control (PC) as follows:

$$PR_{NC} = \frac{\text{Average Abs}_{450} \text{ NC}}{\text{Average Abs}_{450} \text{ PC}} \times 100$$

$$PR_{\text{SAMPLE}} = \frac{\text{Abs}_{450} \text{ Sample}^*}{\text{Average Abs}_{450} \text{ PC}} \times 100$$

* If the sample was run in duplicate, consider the

average of the Abs450 value.

Validity criteria

To confirm the validity of the test the following criteria must be met:

- The average value of the PC (Abs450) must be higher than 1.2 (Abs450 PC > 1.2).
- The Abs450 values of the controls (PC and NC) and samples duplicates must not differ by more than 20% of the corresponding average.
- The Abs450 values of the blank sample must be less than 0.1 (Abs450 Blank sample < 0.1).
- The average Abs450 value of the NC must be less than 0,15 (Average Abs450 NC < 0.15).
- The Average Abs450 PC / Average Abs450 NC ratio must be higher than 8 (Average Abs450 PC / Average Abs450 NC > 8).

If any of these criteria is not fulfilled, the test is considered invalid. In this case, the test should be repeated strictly following the instructions detailed in the Instruction manual included in the kit.

Interpretation of results

The test sample results should be interpreted as follows:

Serum (dilution 1:100)

| PR | Interpretation |
|---------------|----------------|
| ≤ 11% | Negative |
| > 11% a < 20% | Doubtful |
| ≥ 20% | Positive |

Milk (undiluted)

| PR | Interpretation |
|---------------|----------------|
| ≤ 10% | Negative |
| > 10% a < 12% | Doubtful |
| ≥ 12% | Positive |

In the case of obtaining a doubtful result, the sample should be re-tested. If the result is still doubtful, it is recommended

to test a second sample obtained after a period of at least three weeks. If the new sample is doubtful again, the epidemiological situation should be considered and the sample should be analyzed with another technique if available.

Sensitivity and specificity

A total of 774 serum samples and 302 milk samples obtained from animals vaccinated with strain S19 and establishments free of brucellosis (negative samples), and from positive animals (positive samples) were analyzed to determine the diagnostic sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the assay. The group of negative samples included serologically negative samples for all tests (BPAT, CELISA, FPA and CFT*) as well as positive samples by BPAT but negative for the rest of the tests (CELISA, FPA and CFT). Based on these results, a ROC (receiver-operating-analysis) curve analysis was performed. This analysis allowed us to select for the different sample types the cut-off value that concurrently optimized the Se and Sp of the assay and the cut-off values for which a 100 % Se or Sp was achieved.

*BPAT, buffered plate agglutination assay; CELISA, competitive ELISA; FPA, fluorescence polarization assay; CFT, complement fixation test.

Table 1

Sensitivity, specificity and Youden's index.

| Glyco- iELISA | Cut-off value (PR) | Se (%) ^b | Sp (%) ^b | J ^c |
|------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| Suero | | | | |
| | > 11.0 | 100 (95.0-100) | 98.6 (95.9-99.7) | 0.986 |
| | > 20.0 | 97.2 (90.3-99.7) | 100 (98.2-100) | 0.972 |
| Leche | | | | |
| | > 10.0 | 100 (96.1-100) | 99.0 (96.5-99.9) | 0.990 |
| | > 12.0 | 95.7 (89.5-98.8) | 100 (98.2-100) | 0.957 |

(a) PR, percentage of reactivity.

(b) Se, sensitivity (TP/TP+FN) x100; Sp, specificity (TN/TN+FP) x100. Values in parentheses indicate the 95% confidence interval. TP, true positive; TN, true negative; FP, false positive; FN, false negative.

(c) J, Youden's index (Se+Sp-1).

References

-Ciocchini, AE; Rey Serantes, DA; Melli, LJ; Guidolin, LS; Iwashkiw, J; Elena, S; Franco, C; Nicola, AM; Feldman, MF; Comerci, DJ and Ugalde, JE. A bacterial engineered glycoprotein as a novel antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, Aug. 2014, 27; 172(3-4):455-65.

-Iwashkiw, J., Fentabil, M., Faridmoayer, A., Mills, D.C., Pepler, M. Czibener, C., Ciocchini, A.E., Comerci, D.J., Ugalde, J.E. and Feldman, M.F. Exploiting the *Campylobacter jejuni* protein glycosylation system for glycoengineering vaccines and diagnostic tools directed against brucellosis. *Microbial Cell Factories* 2012 Jan 25;11-13.

Solo autorizada su venta a laboratorios inscriptos en la Red Nacional del SENASA.



Elisa



Bovino



Chemtest S.A.

Av. 25 de Mayo 1021, San Martín (C.P. 1650), Buenos Aires, Argentina.

info@chemtest.net - chemtest.net