

VETLIS® Brucella iELISA Ovinos



Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti Brucella ovis en muestras de suero ovino.

Indirect ELISA kit for the detection of anti Brucella ovis antibodies in ovine serum.


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



ELISA



Ovino

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

VETLIS®
Brucella iELISA Ovinos (suero)

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 ovina 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 [Timerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,1 ml
<i>Control negativo</i>	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (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 iELISA Ovinos (suero)

Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti Brucella ovis en muestras de suero ovino.

El kit VETLIS® Brucella iELISA Ovinos es un kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto para la detección de anticuerpos específicos contra el lipopolisacárido rugoso (LPSr) de Brucella ovis en muestras de suero. Gracias a la incorporación de la exclusiva tecnología Pure-R, el kit posee un excelente desempeño diagnóstico. VETLIS® Brucella iELISA Ovinos puede usarse como test de screening (tamizaje) y/o confirmatorio.

Introducción

Brucella ovis es el agente causal de la "Epididimitis Ovina"; esta es una enfermedad infecciosa transmisible que afecta únicamente a ovinos. En el ganado ovino la enfermedad se presenta en forma clínica o subclínica y se caracteriza por lesiones genitales en los carneros y placentitis en las ovejas. Por consiguiente, las consecuencias principales de la enfermedad son una disminución de la fertilidad en los carneros, abortos en las ovejas (poco frecuente), y un incremento de la mortalidad perinatal.

En particular, el control de la epididimitis ovina depende exclusivamente 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 muestras de semen o tejidos de los carneros, o flujos vaginales y leche de las ovejas. 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 basa-

do exclusivamente en el aislamiento de Brucella no siempre sea factible y eficaz. Por estos motivos, el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad se basa principalmente en el diagnóstico serológico mediante la detección de anticuerpos específicos contra el agente infeccioso en muestras de suero.

Principio de la técnica

El kit VETLIS® Brucella iELISA Ovinos es un ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida basado en la detección de anticuerpos del isotipo IgG dirigidos contra el LPSr de Brucella ovis. En este ensayo, las muestras de suero ovino son expuestas a pocillos recubiertos con el LPSr de Brucella ovis (purificado mediante la exclusiva tecnología Pure-R). Si la muestra contiene anticuerpos anti-LPSr, estos se unen al antígeno inmovilizado en el pocillo. Al añadir el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP), se forma un complejo con los anticuerpos anti-LPSr 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 más 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 ovina 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%].

Con cierre hermético. Reutilizable.

-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 I).
- 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 después de su uso.
4. Manipular todos los reactivos siguiendo la Buenas Prácticas de Laboratorio.
5. Las muestras de suero, 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 representan 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 dupli-

cado 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

Llevar la Solución de lavado concentrada 10X a temperatura ambiente (20- 25°C) y agitar muy bien para garantizar la completa disolución de posibles precipitados.

La Solución de lavado concentrada 10X debe diluirse 1/10 con agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I); por ejemplo, agregando 30 ml de Solución de lavado 10X a 270 ml de agua (cantidad suficiente de Solución de lavado 1X para procesar una microplaca: 10 ml para reconstituir el conjugado IgG y el resto para los lavados). Mezclar muy bien antes de usar. Una vez preparada, la Solución de lavado 1X se puede conservar a 2-8°C durante 7 días.

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. Preparar inmediatamente antes de usar.

Para una mayor exactitud, se recomienda pipetear los 10 ml utilizando dos marcas de calibración de la pipeta (por ejemplo: pipeteando dos veces de cero a 5 ml, o una vez de la posición -1 a 9 de la pipeta).

La solución de conjugado sobrante se puede alícuotar en tubos tipo eppendorf y conservar a -20°C (no se puede conservar en el refrigerador) durante un tiempo máximo de 30 días. En este período de tiempo cada alícuota se puede congelar y descongelar una sola vez.

Preparación de los controles para una

microplaca de análisis (96 reacciones)

a. Control positivo (CP) y control negativo (CN)

Los controles (CP y CN) deben diluirse 1:400 utilizando la Solución de lavado 1X.

Opción 1: agregar 5 µl del control correspondiente a 500 µl de Solución de lavado 1X (dilución 1:100) y mezclar bien. Agregar 25 µl de la dilución anterior a 75 µl de Solución de lavado 1X (dilución 1/4; factor de dilución final de las muestras = 1/400) previamente cargados en los pocillos correspondientes y mezclar bien subiendo y bajando con la micropipeta al menos 5 veces.

Opción 2: agregar 2 µl del control correspondiente a 800 µl de Solución de lavado 1X (dilución 1:400) y mezclar bien. Usar 100 µl de cada control diluido por pocillo.

b. Blanco de muestra

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

Preparación de las muestras

Las muestras de suero deben diluirse 1:400 utilizando la Solución de lavado 1X.

Opción 1: agregar 5 µl de suero a 500 µl de la Solución de lavado 1X (dilución 1:100) y mezclar bien. Agregar 25 µl de la dilución anterior a 75 µl de la Solución de lavado 1X (dilución 1/4; factor de dilución final de las muestras = 1/400) previamente cargados en los pocillos correspondientes y mezclar bien subiendo y bajando con la micropipeta al menos 5 veces.

Opción 2: agregar 2 µl de suero a 800 µl de la Solución de lavado 1X (dilución 1:400) y mezclar bien. Usar 100 µl de la muestra diluida por pocillo.

Notas: -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, se deben guardar a -20°C y, en estos casos, las muestras se deben des-

congelar totalmente, llevar a temperatura ambiente y homogeneizar antes de realizar el análisis.

-Las muestras de suero 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 microplaca 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. Ver ítem-Preparación de las muestras.

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 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 del 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 ($PR_{CP} = 100\%$). 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:

$$PR_{CN} = \frac{\text{Promedio Abs450 CN}}{\text{Promedio Abs450 CP}} \times 100$$

$$PR_{\text{Muestra}} = \frac{\text{Abs450 Muestra}^*}{\text{Promedio Abs450 CP}} \times 100$$

* 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 1,1 (Promedio Abs450 CP > 1,1).
- 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 0,11 (Abs450 Blc Mtra < 0,11).
- 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 7 (Promedio Abs450 CP / Promedio Abs450 CN > 7).

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 1:400)

PR	Interpretación
≤ 26%	No Reactivo
> 26 ≤ 57%	Indeterminado
> 57%	Reactivo

En caso de obtener un resultado "Indeterminado" la prueba se debe repetir con la misma muestra. Si el resultado es todavía indeterminado, se recomienda ensayar una segunda muestra obtenida después de un período de, por lo menos, 3 semanas. Si con la nueva muestra se obtiene nuevamente un resultado, 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 más de 350 muestras de suero obtenidas de animales infectados

(muestras positivas) como así también de animales provenientes de establecimientos libres de brucelosis (muestras negativas).

A partir de los resultados obtenidos con estas muestras se realizó un análisis por curvas ROC. Este análisis permitió determinar 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% (ver Tabla 1).

Tabla 1

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

Valor de corte (PR) ^a	Se (%) ^b	Sp (%) ^b	J ^c
> 26	100 (90,7 - 100)	96,7 (94,2 - 98,3)	0,967
> 57	81,6 (65,7 - 92,3)	100 (99,9 - 100)	0,816

(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

-Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. Vigliocco AM, Silva Paulo PS, Mestre J, Briones GC, Draghi G, Tossi M, Nielsen K. Vet Microbiol. 1997 Mar;54(3-4):357-68.

Para asistencia técnica

Tel: (54-11) 2033-1455 (Ext. 6028)
info@chemtest.net
chemtest.net

VETLIS®
Brucella iELISA Ovine (serum)

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-ovine 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>Positive control</i>	Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.1 ml
<i>Negative control</i>	Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0. ml
<i>Instruction manual</i>		1

Name and application

VETLIS®

Brucella iELISA Ovine (serum)

Indirect ELISA kit for the detection of anti *Brucella ovis* antibodies in ovine serum.

The kit VETLIS® Brucella iELISA Ovine is an ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) kit for the indirect detection of specific antibodies against the rough lipopolysaccharide (rLPS) of *Brucella ovis* in ovine serum. Thanks to its exclusive Pure-R technology, the kit has an excellent diagnostic performance. VETLIS® Brucella iELISA Ovinos can be used as a screening and/or a confirmatory test.

Introduction

Brucella ovis is the causative agent of "Ovine Epididymitis", a transmissible infectious disease that affects only sheep. In ovine the disease occurs clinically or subclinically and is characterized by genital lesions in males and placentitis in females. Therefore, the main consequences of the disease are a decrease fertility in rams, abortions in sheep (rare) and increase perinatal mortality. In particular, the control of ovine epididymitis depends exclusively on the detection and killing of infected animals. The confirmatory diagnosis of brucellosis is made directly by isolating the microorganism from samples of semen or tissues of the rams, or vaginal fluids and milk from the sheep. However, due to the slow growth of *Brucella* from primary cultures (up to 7 days), the risk involved in its management and the low sensitivity of the bacteriological isolation determine that the diagnosis based exclusively on the isolation of *Brucella* is not always feasible and effective. For these reasons, the laboratory diagnosis of the disease is based mainly on serological diagnosis by detecting specific antibodies against the infectious agent in serum samples.

Principles of the technique

VETLIS® Brucella ELISA Ovine kit is a solid phase enzyme immunoassay for the detection of IgG specific antibodies against the rough lipopolysaccharide (rLPS) of *Brucella ovis* in serum samples. In this assay the antibodies present in the sample react with the LPSr (purified by the exclusive technology Pure-R) that coat the wells. If the sample contains antibodies against *B. ovis* LPSr, they bind to the well. Upon addition of the horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody, a complex is formed with the IgG antibodies attached to the antigen. 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 and color intensity is directly proportional to the amount of antibodies present in the sample reacting with the antigens. The higher the antibody titer present in the sample, the more intense color develops in the test wells. Adding the stop solution, upon which a color change to yellow is observed, stops the reaction. The results are measured in a microplate spectrophotometer determining 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-ovine 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%) – COR-

ROSIVE.

-Ovine Positive Control Serum

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0.01%].

-Ovine Negative Control Serum

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 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 μ l).

-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.

-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 target sample in duplicate in each test.

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

Reagents preparation for one microplate (96 reactions)

a. Wash solution 1X

The 10X concentrated Wash solution should be brought to room temperature (20-25°C) and mixed to ensure dissolution of any precipitated salts.

The 10X concentrated Wash solution must be diluted 1/10 with distilled (Type II) or ultrapure (Type I) water; for example, adding 30 ml of 10X Wash solution to 270 ml of water (sufficient quantity of Wash solution 1X to process one microplate: 10 ml to reconstitute the IgG conjugate and the rest for the washes). Mix

very well before using. Once prepared, the 1X Wash solution can be stored at 2-8 ° C for up to 7 days.

b. Conjugate

Reconstitute the conjugate by adding 10 ml (per flask) of 1X Wash solution previously prepared (see previous item). Add the Wash solution carefully. Allow to stand for a minute and mix well. Prepare immediately before use.

For greater accuracy it is recommended to pipet the 10 ml using two calibration marks of the pipette (for example: pipetting twice from zero to 5 ml, or once from position -1 to 9 of the pipette).

The remaining conjugate can be aliquoted in Eppendorf type tubes and stored at -20°C (cannot be stored in the refrigerator) for up to 30 days. During this period of time each aliquot can be thaw and re-frozen one time.

Preparation of controls

a. Positive and negative controls

Controls should be diluted 1:400 using the Sample diluent.

Option 1: add 5 µl of the corresponding control to 500 µl of Wash solution 1X (dilution 1:100) and mix well. Add 25 µl of this dilution to 75 µl of Wash solution 1X (dilution 1/4; final dilution factor of the samples = 1/400) previously loaded into the corresponding wells and mix well (up and down with the micropipette at least 5 times).

Option 2: add 2 µl of the corresponding control to 800 µl of Wash solution 1X (dilution 1:400) and mix well. Use 100 µl of each diluted control per well.

b. Sample blank (SB)

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

Sample preparation

Serum samples should be diluted 1:400 using the Wash solution 1X.

Option 1: add 5 µl of serum to 500 µl of Wash solution 1X (dilution 1:100) and mix well. Add 25 µl of this dilution to 75 µl of Wash solution 1X (dilution 1/4; final dilution factor of the samples = 1/400) previously loaded into the corresponding wells and mix well (up and down with the micropipette at least 5 times).

Option 2: add 2 µl of serum to 800 µl of Wash solution 1X (dilution 1:400) and mix well. Use 100 µl of the diluted sample per well.

Notes:

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

-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. Process the controls (positive control, negative control and samples blank) as indicated in Item Preparation of controls.

3. Process the samples as indicated in the 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 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 ($PR_{pc} = 100\%$) 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:

$$PR_{NC} = \frac{\text{Average Abs450 NC}}{\text{Average Abs450 PC}} \times 100$$

$$PR_{\text{SAMPLE}} = \frac{\text{Abs450 Sample}^*}{\text{Average Abs450 PC}} \times 100$$

* 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 1.1 (Abs450 PC > 1.1).
- 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 0.11 (Abs450 Blank sample < 0.11).
- 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 7 (Average Abs450 PC / Average Abs450 NC > 7).

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 1:400)

PR	Interpretation
≤ 26%	Non-Reactive
> 26% ≤ 57%	Indeterminate
> 57%	Reactive

In the case of obtaining an "Indeterminate" result, the sample should be re-tested. If the result is still indeterminate, it is recommended to test a second sample obtained after a period of at

least three weeks. If the new sample is indeterminate again, the epidemiological situation should be considered and the sample should be analyzed with another technique if available.

For technical assistance

Tel: (54-11) 2033-1455 (Ext. 6028)
info@chemtest.net
chemtest.net

Sensitivity and specificity

More than 350 serum samples obtained from animals infected with *B. ovis* and from healthy animals were analyzed to determine the diagnostic sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the assay. Based on these results, a ROC (receiver-operating-analysis) curve analysis was performed. This analysis allowed us to select 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. The cut-off value that simultaneously maximized the Se and Sp (maximum value of the Youden's index, J) matches the cut-off value for which the Se is 100%.

Table 1

Sensitivity, specificity and Youden's index.

Cut-off (PR) ^a	Se (%) ^b	Sp (%) ^b	J ^c
>26	100 (90.7-100)	96.7 (94.2- 98.3)	0.967
>57	81.6 (65.7- 92.3)	100 (99.9- 100)	0.816

(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

-Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. Vigliocco AM, Silva Paulo PS, Mestre J, Briones GC, Draghi G, Tossi M, Nielsen K. *Vet Microbiol.* 1997 Mar;54(3-4):357-68.

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



ELISA



Ovino

 Chemtest S.A.

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