

VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Bovinos



Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-Brucella en muestras de suero y leche de bovinos.

Indirect ELISA kit for the detection of anti-Brucella antibodies in bovine serum and milk.

Uso veterinario

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



ELISA



Bovinos



Chemtest Argentina 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)
Presentaciones / Componentes

Componentes	Descripción	15-VL01-2P Presentación 2 placas	15-VL01-5P Presentación 5 placas
Microplaca de análisis	Microplacas de 96 pocillos (12 strips x 8 pocillos con marco) recubiertas con antígeno, selladas y almacenadas en seco	2 microplacas (192 determinaciones)	5 microplacas (480 determinaciones)
Conjugado 20X IgG	Concentrado 20X (anticuerpos anti-IgG bovina conjugados con peroxidasa de rábano)	1 x 1,25 ml	1 x 3,2 ml
Diluyente del conjugado	Listo para usar - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 25 ml	1 x 60 ml
Solución sustrato-cromógeno	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 25 ml	1 x 60 ml
Solución de frenado	Lista para usar (contiene ácido clorhídrico 1%) - CORROSIVO	1 x 25 ml	1 x 60 ml
Solución de lavado	Concentrada 10X	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 12 litros)	1 x 120 ml (c. s. p. 12 litros)
Diluyente de muestra	Listo para usar - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 120 ml	2 x 120 ml
Control positivo	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,1 ml	1 x 0,2ml
Control negativo	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,1 ml	1 x 0,2 ml
Bolsa de polietileno	Con cierre hermético. Reutilizable.	1	1
Manual de instrucciones		1	1

Nombre y aplicación

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

Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-Brucella en muestras de suero y leche de bovinos.

El kit VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Bovinos es un kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto basado exclusivamente en la detección de anticuerpos específicos contra el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis* en muestras de suero y leche de bovinos.

Gracias a la incorporación de la exclusiva tecnología GlycoEng, VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Bovinos posee un excelente desempeño diagnóstico y puede usarse como prueba de screening (tamizaje) o confirmatoria/complementaria.

Los anticuerpos anti-polisacárido O constituyen un excelente marcador específico de infección brucélica. La detección exclusiva de esos anticuerpos 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 epitopes 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. Las muestras obtenidas antes de los 6 meses post-vacunación con S19 podrían resultar reactivas. Por lo tanto, para los animales vacunados con S19, siempre se deben analizar muestras obtenidas a partir de los 6 meses post-vacunación.

VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Bovinos es una prueba DIVA (diferenciación de animales infectados de vacunados) para cepas vacunales rugosas como RB51 y Apgm porque detecta exclusivamente

anticuerpos anti-polisacárido O, un antígeno que está ausente en estas cepas vacunales.

Introducción

La brucelosis es una zoonosis altamente contagiosa causada por bacterias Gram-negativas del género *Brucella*. La especie *Brucella abortus* es el principal agente causal de la brucelosis del ganado bovino. Esta enfermedad produce, en las hembras preñadas, abortos en periodos 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 aislamiento 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 enzimoimmunoensayo indirecto en fase sólida basado exclusivamente en la detección de anticuerpos IgG anti-polisacárido O de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*. Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos anti-polisacárido O. 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*, estos se unen al antígeno del pocillo. Al añadir el conjugado, anticuerpos anti-IgG bovina conjugados con 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.

Almacenamiento y vencimiento

Conservación: 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.

Período de vida útil: 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 (20, 100 y 1000 µl) 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, muestras y del conjugado.
- Recipiente (probeta) para preparación de solución de lavado.
- Agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I). 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 nuevamen-

te 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 los reactivos

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). Mezclar muy bien antes de usar. Una vez preparada, la Solución de lavado 1X se puede conservar a 2-8°C durante 7 días.

Se recomienda preparar c.s.p. procesar las placas del día.

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

-Diluir 1/20 utilizando el Diluyente del conjugado. Por ejemplo, para procesar la placa completa agregar 9,5 ml del Diluyente del conjugado y 0,5 ml del Conjugado 20X IgG. Homogeneizar muy bien.

Importante:

-No retirar el Conjugado 20X IgG de la heladera hasta su uso.

-Agitar bien el Diluyente del conjugado antes de usarlo.

-Realizar la dilución del conjugado inmediatamente antes del paso 5 (ver ítem Procedimiento del ensayo). El diluyente de conjugado debe encontrarse a temperatura ambiente.

-Preparar sólo el volumen de conjugado necesario para procesar el número de pocillos requerido.

-La solución de conjugado diluida sobrante se debe descartar.

Preparación de los controles

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

Los controles (CP y CN) deben diluirse 1:200 utilizando el Diluyente de muestra.

Agregar 2 µl del control correspondiente a 400 µl de Diluyente de muestra (dilución 1:200) y mezclar bien. Usar 100 µl de cada control diluido por pocillo y por duplicado.

Notas:

-Agitar muy bien el Diluyente de muestra antes de preparar los controles.

-Los controles positivo y negativo provistos se utilizan para procesar indistintamente las muestras de suero o leche.

b. Blanco de muestra (BM)

En cada placa se debe agregar un blanco de muestra (BM) constituido por el Diluyente de muestra. Dispensar directamente 100 µl por pocillo del Diluyente de muestra.

Preparación de las muestras

a. Muestras de suero

Las muestras de suero deben diluirse 1:200 utilizando el Diluyente de muestra. Para ello, agregar 2 µl de suero a 400 µl de Diluyente de muestra. Se utilizan 100 µl de muestra diluida por pocillo.

Notas:

-Agitar muy bien el Diluyente de muestra antes de preparar las muestras.

-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 tanque (pool de muestras proveniente del tanque de almacenamiento) se procesan sin diluir. Se utilizan 100 µl de muestra por pocillo.

Se pueden usar muestras de leche fresca recién obtenidas, conservadas en refrigerador (2-8°C) por un período no mayor a 3 días o muestras de leche congeladas (-20°C). Si se utilizan muestras que fueron almacenadas en el refrigerador o congeladas, estas se deben llevar a temperatura ambiente y homogenizarlas suavemente y en forma completa antes

del análisis.

Notas generales:

Las muestras (suero, leche individual o de tanque) 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.

Procedimiento del ensayo

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. Si no se utiliza toda la placa, separar únicamente los strips de 8 pocillos necesarios para analizar los controles y las muestras. Guardar el resto de los strips, junto con los desecantes, en la bolsa de aluminio original (cerrar el lado abierto con un par de dobles y cinta) y colocarla en la bolsa de polietileno con cierre hermético tipo ziplock incluida en el kit y volver a almacenar en el refrigerador (2-8°C).

Nota: una vez abierto el envoltorio original de la placa, los strips se pueden conservar en la bolsa de polietileno herméticamente cerrada y en el refrigerador (2-8°C) hasta 90 días.

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.

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 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.

Importante: respetar los tiempos de incubación.

Cálculos

Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de reactividad (PR) con respecto al control positivo (CP) incluido en cada ensayo ($PR_{CP} = 100\%$). Los valores de absorbancia medidos a 450 nm (Abs450) de cada muestra se relacionan con el valor de Abs450 del CP de la siguiente forma:

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

* 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 1,8 (Promedio Abs450 CP > 1,8).
- 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 0,25 (Abs450 Blc Mtra < 0,25).
- El valor promedio de la Abs450 del CN debe ser menor a 0,3 (Promedio Abs450 CN < 0,3).
- La relación Promedio Abs450 CP / Promedio Abs450 CN debe ser mayor a 6 (Promedio Abs450 CP / Promedio Abs450 CN > 6).

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

Muestras de suero (dilución 1:200): los resultados deben interpretarse de la siguiente manera:

Resultado positivo: cuando el PR es mayor al 40%.

Resultado negativo: cuando el PR es menor o igual al 30%.

Resultado indeterminado: cuando el PR es mayor al 30% y menor o igual al 40%.

PR	Interpretación
≤ 30%	Negativo
> 30 ≤ 40%	Indeterminado
> 40%	Positivo

Muestras de leche de tanque (sin diluir): los resultados deben interpretarse de la siguiente manera:

Resultado positivo: cuando el PR es mayor al 26,5%.

Resultado negativo: cuando el PR es menor o igual al 25%.

Resultado indeterminado: cuando el PR es mayor al 25% y menor o igual al 26,5%.

PR	Interpretación
$\leq 25\%$	Negativo
$> 25 \leq 26,5\%$	Indeterminado
$> 26,5\%$	Positivo

Muestras de leche individuales (sin diluir): los resultados deben interpretarse de la siguiente manera:

Resultado positivo: cuando el PR es mayor al 55%.

Resultado negativo: cuando el PR es menor o igual al 45%.

Resultado indeterminado: cuando el PR es mayor al 45% y menor o igual al 55%.

PR	Interpretación
$\leq 45\%$	Negativo
$> 45 \leq 55\%$	Indeterminado
$> 55\%$	Positivo

En caso de obtener un resultado indeterminado la prueba se debe repetir. Si el resultado es todavía indeterminado, 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 indeterminado, debería contemplarse la situación epidemiológica y analizar la muestra con otra técnica confirmatoria/complementaria.

Para facilitar los cálculos, la evaluación de los criterios de validez y la interpretación de los resultados de la prueba, se encuentra disponible una planilla de cálculos en la página web de la empresa (<https://www.chemtest.net/elisa-bovi->

[nos.php](https://www.chemtest.net)) o solicitarla vía email a info@chemtest.net.

Importante: verificar siempre que el número de versión del manual de instrucciones provisto en el kit coincida con la versión de la planilla de cálculos.

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

Presentations / Components

Components	Description	15-VL01-2P 2 microplates	15-VL01-5P 5 microplates
Microplate	96-well microtitre plate (12 x 8 strip wells with strip holder) coated with the antigen, sealed and stored in dry	2 microplates (192 tests)	5 microplates (480 tests)
Conjugate 20X IgG	20X concentrated (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG antibodies)	1 x 1.25 ml	1 x 3.2 ml
Conjugate diluent	Ready to use - CONTAINS PRE-SERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ Hg-NaO ₂ S) 0.01%].	1 x 25 ml	1 x 60 ml
Substrate-chromogen solution	Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (H ₂ O ₂)] – STORE IN THE DARK	1 x 25 ml	1 x 60 ml
Stop solution	Ready to use (contains HCl 1%) - CORROSIVE	1 x 25 ml	1 x 60 ml
Wash solution	10X concentrate	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1.2 liters)	1 x 120 ml (c. s. p. 1.2 liters)
Sample diluent	Ready to use - CONTAINS PRE-SERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ Hg-NaO ₂ S) 0.01%].	1 x 120 ml	2 x 120 ml
Positive control	Serum - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.1 ml	1 x 0.2 ml
Negative control	Serum - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.1 ml	1 x 0.2 ml
Polyethylene bag	With ziploc. Reusable	1	1
Instruction manual		1	1

Name and application

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

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

The kit VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Bovines is an iELISA kit (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) is exclusively based in the detection of specific antibodies against the O polysaccharide of the lipopolysaccharide (LPS) of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* in bovine serum and milk.

Thanks to its exclusive GlycoEng technology, VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Bovines has an excellent diagnostic performance and can be used as a screening or confirmatory test.

Anti-O polysaccharide antibodies are an excellent specific marker of brucella infection. The exclusive detection of these antibodies allows to 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. In some cases, samples obtained before 6 months post-vaccination with the strain S19 strain may be reactive. Therefore, the samples from animals vaccinated with S19 should be obtained and analyzed after 6 months post-vaccination.

VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Bovines is a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) test for rough vaccine strains such as RB51 and Δpgm because it exclusively detects anti-O polysaccharide antibodies, an antigen that is absent in these vaccine strains.

Introduction

Brucellosis is a highly contagious zoonotic disease caused by Gram-negative bacteria of the genus *Brucella*. The species *Brucella abortus* is the main 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 abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* anti-O polysaccharide IgG antibodies. A positive result by Brucella Glyco-iELISA Bovines indicates the presence of anti-O polysaccharide antibodies.

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 conjugate, horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-bovine IgG antibodies, 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.

Storage and expiration

Store: 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 dilution of the controls, samples and conjugate.
- Container (graduated cylinder) 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.

Reagents preparation

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

It is recommended to prepare sufficient quantity to process the plates of the day.

b. Conjugate

Dilute 1/20 using the Conjugate diluent. For example, to process the entire plate add 9.5 ml of the Conjugate diluent and 0.5 ml of the 20X IgG conjugate. Homogenize very well.

Important:

-Do not remove the 20X IgG Conjugate from the refrigerator until use.

-Shake the Conjugate diluent thoroughly before use.

-Perform the dilution of the conjugate immediately before step 5 (see item Test procedure). The Conjugate diluent should be at room temperature.

-Only prepare enough volume of diluted conjugate to process the required number of wells.

-The remaining solution of the diluted conjugate should be discarded.

Preparation of controls

a. Positive (PC) and negative (NC) controls

Controls (PC and NC) should be diluted 1:200 using the Sample diluent.

Add 2 µl of the corresponding control to 400 µl of Sample diluent (dilution 1:200) and mix well. Use 100 µl of each diluted control per well and in duplicate.

Notes:

-Shake the Sample diluent thoroughly before preparing the controls.

-The provided positive and negative controls are used to process either serum or milk samples.

b. Sample blank (SB)

On each plate, a sample blank consisting of Sample diluent should be added. Dispense directly 100 µl per well of Sample diluent.

Sample preparation

a. Serum samples

Serum samples should be diluted 1:200 using the Sample diluent. Add 2 µl of serum to 400 µl of Sample diluent. Use 100 µl of diluted sample per well.

Notes:

-Shake the Sample diluent thoroughly before preparing the samples.

-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 or tank milk samples (pooled samples from the storage tank) are processed undiluted. 100 µl of sample is used per well. Freshly collected milk samples, samples stored in a refrigerator (2-8°C) for no more than 3 days, or frozen milk samples (-20°C) can be used. If samples stored in a refrigerator or frozen are used, they must be brought to room temperature and thoroughly homogenized before analysis.

General Notes: Samples (serum, individual milk or tank milk) 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.

Test procedure

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. If the entire plate is not used, separate only the 8-well strips needed to analyze the controls and samples. Store the rest of the strips, along with the desiccants, in the original foil bag (seal the open side with a couple of folds and adhesive tape) and place it in the ziplock-type polythene bag included in the kit and store in the refrigerator (2-8°C).

Note: once the original packaging of the plate has been opened, the strips can be kept in the closed polyethylene bag and in the refrigerator (2-8 °C) up to 90 days.

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.

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.

Important: respect incubation times.

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 are related to the Abs450 value of the positive control (PC) as follows:

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

* 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 1.8 (Abs450 PC > 1.8).
- 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 0.25 (Abs450 Blank sample < 0.25).
- The average Abs450 value of the NC must be less than 0,3 (Average Abs450 NC < 0.3).
- The Average Abs450 PC / Average Abs450 NC ratio must be higher than 6 (Average Abs450 PC / Average Abs450 NC > 6).

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

Serum samples (dilution 1:200): the results should be interpreted as follows.

PR	Interpretation
≤ 30%	Negative
> 30 ≤ 40%	Indeterminate
> 40%	Positive

Positive result: when the PR is higher than 40%.

Negative result: when the PR is lower than or equal to 30%.

Indeterminate result: when the PR is higher than 30% and lower or equal to

40%.

Tank milk samples (undiluted): the results should be interpreted as follows.

PR	Interpretation
≤ 25%	Negative
> 25 ≤ 26.5%	Indeterminate
> 26.5%	Positive

Positive result: when the PR is higher than 26.5%.

Negative result: when the PR is lower than or equal to 25%.

Indeterminate result: when the PR is higher than 25% and lower or equal to 26.5%.

Individual milk samples (undiluted): the results should be interpreted as follows.

PR	Interpretation
≤ 45%	Negative
> 45 ≤ 55%	Indeterminate
> 55%	Positive

Positive result: when the PR is higher than 55%.

Negative result: when the PR is lower than or equal to 45%.

Indeterminate result: when the PR is higher than 45% and lower or equal to 55%.

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.

To facilitate the calculations, the evaluation of the validity criteria of the test and the interpretation of the results, a calculation sheet is available on the company's website (<https://www.chemtest.net/>)

en/elisa-bovines.php) or request it via email to info@chemtest.net.

Important: always check that the version number of the instruction manual provided in the kit matches the version of the spreadsheet.

Para asistencia técnica / For technical assistance

Tel: (+54)9-11-5353-6066, info@chemtest.net, chemtest.net

Referencias / References

-Ciocchini, AE; Rey Serantes, DA; Melili, LJ; Guidolin, LS; Iwashkiw, J; Elena, S; Franco, C; Nicola, AM; Feldman, MF; Commerci, 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. Czibener, C., Ciocchini, A.E., Commerci, 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.

SENASA

-Certificado de uso y comercialización

N° 20-009

-Estab. Elaborador N° 8675

Uso veterinario

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

Advertencias: mantener fuera del alcance de los niños y animales domésticos. Centro Nacional de Intoxicaciones: Tel. 0800-333-0160.



ELISA



Bovinos



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