

# VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Caprinos



Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti *Brucella melitensis* en muestras de suero de caprinos.

*Indirect ELISA kit for the detection of anti *Brucella melitensis* antibodies in caprine serum.*

## Uso veterinario


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



ELISA



Caprinos

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

VETLIS®  
Brucella Glyco-iELISA Caprinos (suero)

## Presentaciones / Componentes

Componentes	Descripción	15-VL05-2P Presentación 2 placas	15-VL05-5P 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	Liofilizado (anticuerpos anti-IgG caprina conjugados con peroxidasa de rábano)	2 unidades	5 unidades
Solución sustrato-cromógeno	Lista para usar [3,3',5,5'-Tetrametilbencidina en solución de sustrato con peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )] - CONSERVAR EN OSCURIDAD	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de frenado	Lista para usar (contiene ácido clorhídrico 1%) - CORROSIVO	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de lavado	Concentrada 10X	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	1 x 120, 1 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,8 litros)
Diluyente de muestra	Para reconstituir - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0,01%]	1 x 120 ml	2 x 120 ml
Control positivo	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0,01%]	1 x 0,1 ml	1 x 0,2 ml
Control negativo	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> 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 Caprinos (suero)**

Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti *Brucella melitensis* en muestras de suero de caprinos.

El kit VETLIS® **Brucella Glyco-iELISA Caprinos** 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 melitensis* en muestras de suero de caprinos. El kit posee un excelente desempeño diagnóstico minimizando las reacciones cruzadas con otras bacterias Gram-negativas.

## Introducción

La brucelosis es una zoonosis altamente contagiosa causada por bacterias Gram-negativas del género *Brucella*. La brucelosis animal tiene un impacto económico importante debido a que la infección provoca abortos, mortinatos y reduce la fertilidad, mientras que la brucelosis en humanos es una enfermedad debilitante caracterizada por fiebre, sudoración y dolor que puede progresar a la cronicidad con graves complicaciones para la salud. *Brucella melitensis* es la principal especie responsable de la brucelosis del ganado caprino y uno de los principales patógenos humanos, junto con *B. suis* y *B. abortus*. 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 caprino. La brucelosis en humanos puede ser muy 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 reservorios de la enfermedad. En particular, el control de la brucelosis caprina depende exclusivamente de la vacunación, principalmente con la cepa *B. melitensis* Rev.1, y 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 estos motivos, el diagnóstico de laboratorio de brucelosis caprina 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 Glyco-iELISA Caprinos** es el primer enzimoimmunoensayo 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 Caprinos** 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 epitopes comunes presentes en el lípido A y el core oligosacarídico del LPS de otras bacterias.

En este ensayo las muestras de suero son expuestas a pocillos recubiertos con el antígeno (glicoproteína recombinante purificada) de *Brucella*. Si la muestra contiene anticuerpos anti-polisacárido

O de *Brucella melitensis*, 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.

### **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 (10, 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 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 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 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 pipeta 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 300 ml de Solución de lavado 1X (suficiente para un microplaca) agregando 30 ml de Solución de lavado 10X a 270 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.

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

#### **b. Conjugado**

Reconstituir el Conjugado liofilizado añadiendo 13 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 veces mediante agitación cabeza-cola). Preparar antes de usar.

Para una mayor exactitud, se recomienda pipetear los 13 ml utilizando dos marcas de graduación de la pipeta (por ejemplo: pipeteando dos veces de cero a 6,5 ml).

El conjugado una vez reconstituido se puede conservar a -20°C por un tiempo máximo de 3 meses (no puede ser almacenado en el refrigerador) y durante este período sólo se puede congelar y descongelar una vez.

#### **c. Diluyente de muestra**

Reconstituir el Diluyente de muestra agregando la Solución de lavado 1X preparada previamente hasta el nivel indicado en el frasco correspondiente (aproximadamente 120 ml) y mezclar muy bien hasta lograr una completa disolución. Preparar inmediatamente antes de usar.

El Diluyente de muestra remanente se puede conservar en el refrigerador (2 a 8°C) hasta 3 meses o a -20°C durante un año. Antes de usar, descongelar totalmente, llevar a temperatura ambiente y mezclar muy bien hasta completa disolución.

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

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

En tubos de 1,5 ml agregar 2 µl de cada control a 400 µl del Diluyente de muestra (dilución 1:200). Mezclar bien antes de usar. En cada microplaca los controles positivo y negativo se agregan al menos por duplicado (100 µl por pocillo).

#### **b. Blanco de muestra (BM)**

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

### **Preparación de las muestras**

Las muestras de suero deben diluirse 1:200 utilizando el Diluyente de muestra. Para ello, agregar 2 µl de suero a 400 µl del Diluyente de muestra. Se utilizan 100 µl de 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 descongelar 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 pue-

den 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 se 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 polietileno con cierre hermético 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. 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 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 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 ±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. 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:

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

\* Abs<sub>450</sub> 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 0,15 (Abs450 Blc Mtra < 0,15).
- El valor promedio de la Abs450 del CN debe ser menor a 0,2 (Promedio Abs450 CN < 0,2).
- 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

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

Suero (dilución 1:200)

PR	Interpretación
≤ 30%	Negativo
> 30% a < 43%	Indeterminado
≥ 43%	Positivo

En caso de obtener un resultado indeterminado se debe repetir la prueba. 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, de ser posible, analizar la muestra con otra técnica.

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-caprinos.php>) o solicitarla vía email a [info@chemtest.net](mailto: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.

### Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Para determinar la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) diagnóstica del ensayo, se analizaron más de 400 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 (PR=30), que coincide con el valor de corte para el cual se alcanza la máxima sensibilidad (99%), y el punto de corte para alcanzar una Sp del 100% (PR=43)(ver Tabla 1).

Tabla 1

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

Valor de corte (PR) <sup>a</sup>	Se (%) <sup>b</sup>	Sp (%) <sup>b</sup>	J <sup>c</sup>
30	99,0 (94,5-99,9)	99,3 (97,7-99,9)	0,983
43	98,0 (92,9-99,6)	100 (98,8-100)	0,980

(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**

-Cristina Franco. Brucelosis Caprina. Desarrollo de nuevos inmunodiagnósticos basados en el uso de glicoconjugados recombinantes . Tesis de maestría para optar al título de Magíster de la Universidad de Buenos Aires en Biotecnología, Universidad de Buenos Aires. 2016.

-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.

## **Advertencias**

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

## **SENASA**

-Certificado de uso y comercialización  
N°: Primera serie a control E/T  
-Estab. Elaborador N° 8675

## **Para asistencia técnica**

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



VETLIS®  
Brucella iELISA Caprine (serum)

Presentations / Components

Components	Description	15-VL05-2P 2 microplates	15-VL05-5P 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	Lyophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-caprine IgG antibodies)	2 units	5 units
Substrate-chromogen solution	Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )] – STORE IN THE DARK	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Stop solution	Ready to use (contains HCl 1%) - CORROSIVE	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Wash solution	10X concentrate	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1.2 liters)	1 x 120, 1 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1.8 liters)
Sample diluent	To reconstitute - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0.01%]	1 x 120 ml	2 x 120 ml
Positive control	Serum - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0.01%]	1 x 0.1 ml	1 x 0.2 ml
Negative control	Serum - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> 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 Caprine (serum)**

Indirect ELISA kit for the detection of anti *Brucella melitensis* antibodies in caprine serum.

The kit **VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Caprine** 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 melitensis* in caprine serum. The kit has an excellent diagnostic performance and minimizes cross-reaction with other Gram-negative bacteria.

## Introduction

Brucellosis is a highly contagious zoonosis disease caused by Gram-negative bacteria of the genus *Brucella* that affects animals and human beings. Animal brucellosis has a major economic impact because the infection causes abortions, stillbirths and reduces fertility in herds, while brucellosis in humans is a debilitating disease characterized by fever, sweating and pain that can progress to chronicity with serious health complications.

*Brucella melitensis* is the etiological agent of caprine brucellosis and one of the main human brucellosis pathogens together with *B. suis* and *B. abortus*. 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 goats. 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.

Control of the disease in goats depends on vaccination with the strain *B. melitensis* Rev.1, in combination with the detection and slaughter of infected animals. The gold standard method for confirmation of the infection is the isolation of the pathogen; however, the slow growth of brucellae in primary cultures (up to 7 days), the risk involved in their handling and the poor sensitivity makes diagnosis based solely on isolation of brucellae non-effective, not always feasible and expensive. For these reasons, the **laboratory diagnosis of caprine brucellosis is mainly based on the detection of specific antibodies against the infectious agent in serum samples.**

## Principle of the technique

The **VETLIS® Brucella Glyco-iELISA Caprine** 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 Caprine* indicates the presence of anti-O polysaccharide antibodies. These antibodies are an excellent specific marker of *brucella* infection, which can confirm the diagnosis of the infection by eliminating the risk of false-positive cross-reactions due to the presence of antibodies against common epitopes present in the lipid A and the core of the LPS from other bacteria. In this assay, serum samples are exposed to the wells coated with the *Brucella* antigen (purified recombinant glycoprotein). If the sample contains anti *Brucella melitensis* 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-chromo-

gen 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 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 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

Prepare 300 ml of 1X Wash Solution (enough for a microplate) by adding 30 ml of 10X Wash Solution to 270 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.

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

### b. Conjugate

Reconstitute the conjugate by adding 13 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 once or twice by head-to-tail agitation). Prepare before use.

For greater accuracy it is recommended to pipet the 13 ml using two graduation marks of the pipette (for example: pipetting twice from zero to 6.5 ml).

The reconstituted conjugate should be stored at -20°C (cannot be stored in the refrigerator) for not more than 3 months and during this period can be thaw and re-freeze just once.

### c. Sample diluent

Reconstitute the Sample diluent by adding the 1X Wash solution previously prepared (see previous item) up to the level indicated in the corresponding bottle (approximately 120 ml) and mix very well. Prepare immediately before use.

The remaining Sample diluent can be stored in the refrigerator (2 to 8°C) up to 3 months or at -20°C for a year. Thaw it completely, bring to room temperature and mix very well until complete dissolution before using.

## Preparation of controls for one microplate (96 reactions)

### a. Positive and negative controls

In tubes of 1.5 ml, add 2 µl of each control to 400 µl of Sample diluent (1:200 dilution). Mix well before using. In each microplate positive and negative controls should be added at least in dupli-

cate (100 µl per well).

### b. Sample blank (SB)

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

## Sample preparation

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:

-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.

-Samples 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. 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, together with the desiccants, in the polyethylene bag with hermetic seal included in the kit and store it again 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 sample. See 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.

**Important:** respect incubation times.

### Calculations

#### Expression of results

Results are expressed as the percentage of reactivity (PR) with respect to the positive control (PC) included in each test. The absorbance values measured at 450 nm

(Abs450) of each sample are related to the Abs450 value of the 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 1.2 (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 0.15 (Abs450 Blank sample < 0.15).
- The average Abs450 value of the NC must be less than 0.2 (Average Abs450 NC < 0.2).
- 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

The test sample results should be interpreted as follows:

Serum (dilution 1:200)	
PR	Interpretation
≤ 30%	Negative
> 30% a < 43%	Indeterminate
≥ 43%	Positive

In the case of obtaining an indeterminate result, the sample should be re-test-

ed. 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/elisa-caprines.php>) or request it via email to [info@chemtest.net](mailto:info@chemtest.net). **Important:** always check that the version number of the instruction manual provided in the kit matches the version of the spreadsheet.

### Sensitivity and specificity

More than 400 serum samples obtained from infected animals (positive samples) as well as from animals coming from establishments free of brucellosis (negative samples) 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 (PR=30) and for which the maximum sensitivity is reached (99%), and the cut-off value for which the Sp is 100% (PR=43) (Table 1).

Table 1

Sensitivity, specificity and Youden's index.

Cut-off (PR) <sup>a</sup>	Se (%) <sup>b</sup>	Sp (%) <sup>b</sup>	J <sup>c</sup>
30	99,0 (94,5-99,9)	99,3 (97,7-99,9)	0,983
43	98,0 (92,9-99,6)	100 (98,8-100)	0,980

(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

-Cristina Franco. Brucellosis Caprina. Desarrollo de nuevos inmunodiagnósticos basados en el uso de glicoconjugados recombinantes. Tesis de maestría para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Biotecnología, Universidad de Buenos Aires. 2016.

-Iwashkiw, J., Fentabil, M., Faridmoayer, A., Mills, D.C., Pepler, 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.

### For technical assistance

Tel: (54-11) 2033-1455 (Ext. 6028)

[info@chemtest.net](mailto:info@chemtest.net)

[chemtest.net](http://chemtest.net)



#### 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



Caprinos



Chemtest Argentina S.A.

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

[info@chemtest.net](mailto:info@chemtest.net) - [chemtest.net](http://chemtest.net)