

MONOSCREEN^{Ab} ELISA

Instrucciones de uso
 BIOK140-BRUC_NO_(ES)_V01
 23/01/2025

Monoscreen AbELISA Brucella

Referencia: BIO K 140

Prueba ELISA para el diagnóstico serológico de la brucelosis

Monocúpula, prueba indirecta

Uso *in vitro* y estrictamente veterinario



Muestra	Especie	Análisis individual	Análisis en mezcla*, posible hasta
Suero	Bovino	✓	10

* Las mezclas se deben hacer volumen a volumen, es decir, utilizando el mismo volumen de cada uno de los sueros que forman la mezcla.

Presentación

Referencia de producto	BIO K 140/5
Formato	5 placas, tira de 8 pocillos
Reacciones	480 pruebas

Composición del kit

Material suministrado		BIO K 140/5
Microplate	Microplaca	5
Washing solution	Solución de lavado (20X)	1 x 250 ml
Dilution solution	Solución de dilución teñida (1X)	3 x 250 ml
TMB solution	Solución de TMB (1X)	1 x 55 ml
Stop solution	Solución de frenado (1X)	1 x 55 ml
Conjugate	Conjugado (50X)	1 x 1,5 ml
CTL POS	Control positivo	1 x 0,5 ml
CTL NEG	Control negativo	1 x 0,5 ml

Historial de revisiones

Fecha	Versión	Modificaciones
23/01/2025	V01	Primera versión

Nota: Las modificaciones menores de tipografía, gramática y maquetación no aparecen en el historial de revisiones

A. Introducción

La brucelosis es una enfermedad causada por el agente patógeno *Brucella* sp. Es una bacteria perteneciente al orden de las Rhizobiales. Los casos de brucelosis animal debida a infecciones por *Brucella melitensis* suelen observarse en la cuenca mediterránea y en Oriente Medio. *Brucella abortus* es una bacteria ubicua mientras que los casos debidos a *Brucella suis* se encuentran principalmente en América, Asia y Oceanía.

Los animales se infectan por ingestión de productos contaminados y por aerosoles. También se observan transmisiones verticales durante la lactancia de las crías cuya madre está contaminada. A diferencia de otras bacterias como *Salmonella* o *Listeria*, la infección por *Brucella* suele ser asintomática. No obstante, *Brucella* puede provocar una inflamación crónica y la formación de higromas que causan dolor articular. En los machos, las bacterias se excretan en el esperma, lo cual da lugar a una inflamación del testículo o el epidídimo que a su vez provoca una orquitis o una epididimitis respectivamente. Las complicaciones de la enfermedad pueden provocar la infertilidad de los machos infectados. La principal consecuencia de la infección por *Brucella* en las hembras gestantes es el aborto. En las placentas de los animales gestantes infectados se observan diversas lesiones con tejido necrótico.

Las bacterias se localizan, principalmente, en el aparato reproductor y en los tejidos fetales, lo cual provoca infecciones en los fetos en el interior del útero, además de un nivel elevado de bacterias en las placentas y líquidos fetales que dan lugar a nuevas infecciones durante el parto o el aborto por consumo y por aerosol.

B. Principio de la prueba

Se utiliza un antígeno sintético de *Brucella* para sensibilizar microplacas de 96 pocillos. Los sueros y los controles se diluyen en la solución de dilución. Tras 60 minutos de incubación y una etapa de lavado, el operador añade el conjugado de la proteína G unido a la peroxidasa. Tras una segunda incubación de 60 minutos y un segundo lavado, se añade el cromógeno tetrametilbenzidina (TMB). Este cromógeno tiene la doble ventaja de ser más sensible que otros cromógenos de peroxidasa y de no ser cancerígeno.

En caso de presencia de inmunoglobulinas específicas de *Brucella* en el suero, el conjugado permanece fijado en la cúpula que contiene el antígeno *Brucella* y la enzima cataliza la transformación del cromógeno incoloro en un producto azul. La intensidad de la coloración es proporcional al contenido en anticuerpos específicos presentes en la muestra.

C. Material y equipamiento necesarios, pero no suministrados

- Agua destilada/desmineralizada.
- Pipeta mono o multicanal de precisión (gama 2-20 µl, 20-200 µl y 100-1000 µl), conectores de un solo uso y reservorios para reactivos.
- Lector de microplaca (filtro 450 nm).
- Limpiador de microplacas (opcional).
- Microplacas de dilución.
- Incubadora a 21 ± 3 °C.
- Material de laboratorio estándar: probeta graduada, gradilla, tapa, ...

Kit complementario

- **Material de referencia para la serología de la brucelosis con ELISA (Ref.: BDE K 140) disponible previa solicitud.**

D. Precauciones de uso

- Almacenar estos reactivos entre +2 y +8 °C.
- Las tiras no utilizadas se conservan en el sobre de aluminio cerrado herméticamente con su desecante.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- No utilizar reactivos de otros kits.
- Utilizar siempre agua destilada / desmineralizada.
- La solución de frenado está hecha con ácido fosfórico 1 M. Manipular este producto con cuidado.
- Eliminar el material utilizado respetando la legislación en vigor en materia de protección del medio ambiente y de gestión de residuos biológicos.
- Conservar la solución de TMB protegida de la luz.

E. Preparación de las soluciones

- Las soluciones se deben preparar antes de la utilización.
- La solución de lavado se debe diluir en agua destilada / desmineralizada **en una proporción de 1:20**. La solución cristaliza de forma espontánea en frío. Llevar el frasco a 21 ± 3 °C para que desaparezcan todos los cristales; mezclar bien la solución y extraer el volumen necesario.
- La solución de dilución está lista para ser utilizada. La solución de dilución es de color amarillo. Se utiliza para la dilución de las muestras, los controles positivo y negativo, y el conjugado.
- El conjugado se debe diluir en la solución de dilución **en una proporción de 1:50**.
- La solución de frenado está lista para ser utilizada.
- La solución de TMB está lista para ser utilizada. La solución debe ser completamente incolora.

F. Preparación de las muestras

- Las muestras de sueros, así como los controles del kit (positivo y negativo) se deben diluir en la solución en una proporción 1:100 y homogeneizar a continuación. Se debe evitar el uso de muestras hemolizadas o coaguladas.

Se recomienda la dilución en dos etapas:

- 1) 10 µl de muestra + 90 µl de solución de dilución en microplaca de dilución.
- 2) 10 µl de la primera etapa + 90 µl de solución de dilución en la placa de la prueba.

G. Procedimiento

- Todos los componentes deben llevarse a 21 ± 3 °C antes de su utilización.
 - Leer atentamente los puntos anteriores.
1. Distribuir las muestras de suero **diluidas** y los controles del kit **diluidos** a razón de **100 µl** por pocillo. Cubrir e incubar la placa a **21 ± 3 °C** durante **60 ± 5 min**.
 2. Eliminar el contenido de la microplaca. **Lavar 3 veces** la microplaca con **300 µl** de solución de lavado por pocillo. Evitar la formación de burbujas en las cúpulas y que la microplaca se seque entre los lavados.
 3. Añadir **100 µl** de **conjugado diluido** por pocillo. Cubrir e incubar la placa a **21 ± 3 °C** durante **60 ± 5 min**.
 4. Eliminar el contenido de la microplaca. **Lavar 3 veces** la microplaca con **300 µl** de solución de lavado por pocillo. Evitar la formación de burbujas en las cúpulas y que la microplaca se seque entre los lavados.
 5. Dispensar **100 µl** de la solución TMB por pocillo. Incubar a **21 ± 3 °C** durante **10 ± 1 min**, protegida de la luz, y sin cubrir.
 6. Dispensar la **solución de frenado** a razón de **100 µl** por pocillo. El color cambia de azul a amarillo.
 7. Registrar las densidades ópticas con un espectrofotómetro de placa mediante un filtro de **450 nm** durante los **5 minutos** siguientes a la incorporación de la solución de frenado.

H. Validación de los resultados

La prueba solo se considerará **válida** si:

- la diferencia entre las lecturas de densidad óptica (DO) del control positivo y del control negativo es superior a 0,600.

$$DO \text{ control positivo} - DO \text{ control negativo} > 0,600$$

- la densidad óptica del control positivo es superior a 1,65 y la del control negativo, inferior a 0,25.

I. Interpretación de los resultados

Calcular el coeficiente (M/P %) para cada muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\%E/P = \frac{DO \text{ échantillon} - DO \text{ contrôle négatif}}{DO \text{ contrôle positif} - DO \text{ contrôle négatif}} * 100$$

	Resultados	Estatus
Muestra individual	% M/P < 40 %	Negativo
	% M/P ≥ 40 %	Positivo
Mezcla de 10	% M/P < 15 %	Negativo
	% M/P ≥ 15 %	Positivo

Obtenga rápida y fácilmente la interpretación de sus resultados gracias a nuestra plataforma en línea gratuita **AnalysisScreen**, disponible en nuestro sitio web: <https://www.biox.com>



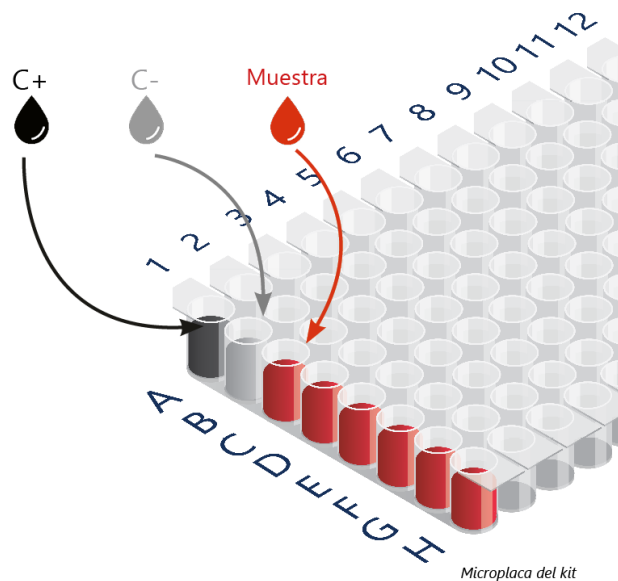
AnalysisScreen™ es el nuevo módulo de lectura e interpretación de todos los tipos de placas ELISA Monoscreen™ y Multiscreen™. AnalysisScreen™ es:

- Gratuito
- Accesible en línea a través de nuestro sitio web: <https://www.biox.com>
- Actualizado en tiempo real
- Compatible con todos los diseños de placas Bio-X Diagnostics
- Muy fácil de usar



SCAN ME

- 1 Dispensar 100µL de muestras diluidas (1/100) y de los controles del kit diluidos (control positivo y negativo) (1/100)



- 2 Añadir 100 µl de conjugado diluido (1/50)

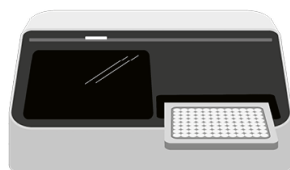


- 3 Añadir 100 µL de TMB



- 4 Añadir 100 µl de solución de frenado

- 5 Registrar las densidades ópticas



*Las notas no sustituyen al modo de empleo, ya que son únicamente un resumen del mismo.