

VETLIS® Brucella iELISA Caninos



Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti Brucella canis en muestras de suero de caninos.

Indirect ELISA kit for the detection of anti Brucella canis antibodies in canine serum.

Uso veterinario



ELISA



Caninos



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

VETLIS®
Brucella iELISA Caninos (suero)
Presentaciones / Componentes

Componentes	Descripción	15-VL03-2P Presentación 2 placas	15-VL03-5P 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 10X IgG	Concentrado 10X (anticuerpos anti-IgG canina conjugados con peroxidasa de rábano)	1 x 2,5 ml	1 x 6,5 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. 1,2 litros)	1 x 120 y 1 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,8 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 y 1 x 60 ml
Control positivo	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,1 ml	2 x 0,1 ml
Control negativo	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,1 ml	2 x 0,1 ml
Bolsa de polietileno	Con cierre hermético. Reutilizable.	1	1
Manual de instrucciones		1	1

Nombre y aplicación

VETLIS®

Brucella iELISA Caninos (suero)

Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti *Brucella canis* en muestras de suero de caninos.

El kit VETLIS® *Brucella iELISA Caninos* es un kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto para la detección de anticuerpos específicos contra el lipopolisacárido rugoso (LPSr) de *Brucella canis* en muestras de suero.

Introducción

La brucelosis es una zoonosis altamente contagiosa causada por bacterias Gram-negativas del género *Brucella*. *Brucella canis* es el principal agente etiológico de la brucelosis canina. Esta enfermedad constituye una causa importante de fallas reproductivas principalmente en las "perreras" o criaderos de perros. *B. canis* causa abortos y muerte fetal intrauterina (mortinatos) en perras gestantes y epididimitis, orquitis, prostatitis y anomalidades espermáticas en machos. Estas manifestaciones clínicas pueden conducir a la esterilidad, un factor que produce importantes pérdidas económicas en criaderos de perros. Los perros que han sido castrados no tienen signos reproductivos, pero ocasionalmente desarrollan otras afecciones tales como enfermedad ocular y discospondilitis. Entre los perros la infección se transmite a través de fetos abortados contaminados, orina, leche, secreciones vaginales y semen. Además, *B. canis* puede propagarse a través de fómites; se ha demostrado que los perros no infectados que viven con animales infectados del mismo sexo pueden adquirir la infección dentro de los 6 meses. Debido a su potencial zoonótico, *B. canis* también puede transmitirse al hombre produciendo la enfermedad.

El control de la brucelosis canina depende exclusivamente de la detección y se-

paración 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, orina, 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 canina 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 Caninos* es un ensayo inmunológico indirecto en fase sólida basado en la detección de anticuerpos del isotipo IgG dirigidos contra el lipopolisacárido rugoso (LPSr) de *Brucella canis*.

En este ensayo, las muestras de suero canino son expuestas a pocillos recubiertos con el antígeno (LPSr) de *Brucella canis*. 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 (12 strips x 8 pocillos con marco) recubiertas con el antígeno, selladas y almacenadas en seco.
- Solución de lavado
- Concentrada 10X.
- Conjugado 10X IgG
- Concentrado 10X (anticuerpos anti-IgG canina 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.
- Diluyente de muestra
- Listo para usar – CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0,01%].
- Agitar bien antes de usar.
- Control positivo
- Suero – CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0,01%].
- Control negativo
- Suero – CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0,01%].
- Bolsa de polietileno
- Con cierre hermético. Reutilizable.
- Manual de instrucciones

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 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 nuevamente a 2-8°C inmediatamente después de su uso.
4. Manipular todos los reactivos siguiendo la Buenas Prácticas de Laboratorio.
5. Las muestras de suero, 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 ca-

ducidad o si los componentes no fueron conservados en las condiciones indicadas arriba.

7. No mezclar componentes o manuales de instrucciones de kits de distintos lotes.

8. Manipule los componentes del kit con cuidado para evitar la contaminación de los mismos.

9. Si se reutilizan los contenedores para pipeta multicanal, los mismos deben ser lavados de forma exhaustiva con agua de alta calidad e identificados para ser reutilizados con la misma solución.

10. Usar puntas de pipetas distintas para cada reactivo y para cada muestra.

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

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

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

a. Solución de lavado 1X

Preparar 400 ml de Solución de lavado 1X agregando 40 ml de Solución de lavado 10X a 360 ml de agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I). Volumen suficiente para procesar una microplaca completa incluyendo la dilución del conjugado IgG y 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.

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

Diluir 1/10 utilizando la Solución de lavado 1X. Por ejemplo, para procesar una placa completa agregar 9 ml de la Solución de lavado 1X y 1 ml del Conjugado 10X IgG. Homogeneizar muy bien.

Importante:

-diluir el conjugado solo inmediatamente antes de usarlo.

-preparar sólo el volumen de conjugado suficiente para procesar el número de pocillos requerido.

-la solución de conjugado diluida sobrante se debe descartar.

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

a. Control positivo y control negativo

En tubos de 1,5 ml agregar 5 µl de cada control a 495 µl de Diluyente de muestra (dilución 1/100) y mezclar bien. Agregar 25 µl de la dilución anterior a 75 µl de Diluyente de muestra (dilución 1/4; factor de dilución final de los controles = 1/400) previamente cargados en los pocillos correspondientes y mezclar bien subiendo y bajando con la micropipeta al menos 5 veces. En cada microplaca los controles positivo y negativo se agregan al menos por duplicado.

Importante: agitar bien el Diluyente de muestra antes de usarlo.

b. Blanco de muestra

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

Preparación de las muestras

Las muestras de suero deben diluirse 1/400 utilizando el Diluyente de muestra. Para ello, en tubos de 1,5 ml agregar 5 µl de suero en 495 µl de Diluyente de muestra (dilución 1/100) y mezclar bien. Agregar 25 µl de la dilución anterior a 75 µl de Diluyente de muestra (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.

Notas:

-Se pueden analizar sueros refrigerados o congelados, libres de turbidez. Las muestras se pueden conservar 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.

-Las muestras se pueden analizar en un solo pocillo. Sin embargo, se recomienda analizarlas 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. 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. Procesar los controles (control positivo, control negativo y blanco de muestra). Ver ítem Preparación de los controles.

3. Procesar las 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 al menos por duplicado.

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

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

Nota: Retirar el líquido completamente después de cada lavado por volcado y golpeando

la placa sobre material absorbente o aspiración con pipeta. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de agregar el reactivo siguiente.

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

7. Repetir el paso 5.

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

9. Detener la reacción agregando 100 µl de Solución de frenado en cada pocillo y mezclar cuidadosamente aplicando ligeros golpes en los bordes de la placa. La Solución de frenado debe agregarse en el mismo orden y velocidad que la Solución sustrato-cromógeno (ver paso 8).

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

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

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 de CP de la siguiente forma:

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

* 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 1,0 (Promedio Abs450 CP > 1,0).
- Los valores de Abs450 de los duplicados de los controles (CP y CN) y las muestras no deben diferir en más del 20% con respecto al promedio del duplicado.
- Los valores de Abs450 del Blanco de muestra (Blc Mtra) deben ser inferiores a 0,1 (Abs450 Blc Mtra < 0,1).
- El valor promedio de la Abs450 del CN debe ser menor a 0,15 (Promedio Abs450 CN < 0,15).
- La relación Promedio Abs450 CP / Promedio Abs450 CN debe ser mayor a 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 1/400)

PR	Interpretación
≤ 32%	Negativo
> 32% ≤ 51%	Indeterminado
> 51%	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 si esto fuera posible.

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-caninos.php>) 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.

Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Para determinar la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) diagnóstica del ensayo, se analizaron más de 1300 muestras de suero obtenidas de animales infectados (muestras positivas) y de animales provenientes de criaderos de perros 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
32	100 (95,1-100)	97,8 (95,0-99,3)	0,978
51	98,6 (92,6-99,9)	100 (98,4-100)	0,986

(a) PR, porcentaje de reactividad.

(b) Se, sensibilidad $(TP/TP+FN) \times 100$; Sp, especificidad $(TN/TN+FP) \times 100$. 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 of Improved Ezyme-based and Lateral Flow Immunoassays for Rapid and Accurate Serodiagnosis of Canine Brucellosis. M. E. Cortina, A. Novak, L. J. Melli, S. Elena, N. Corbera, J. E. Romero, A. M. Nicola, J. E. Ugalde D. J. Comerci and A. E. Ciocchini. Veterinary Microbiology 2017 Sep;208:174-180.

-The feasibility of using antigens prepared with rough Brucella strains for diagnosis of canine brucellosis. G. I. Escobar, E. J. Boeri, S. M. Ayala, N. E. Lucero. Revista Argentina de Microbiología (2010) 42: 35-40.

-Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of Brucella canis infection in dogs. N. E. Lucero, G. I. Escobar, S. M. Ayala and G. Lopez. J. Med. Microbiol. Vol. 51 (2002), 656–660.

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° 20-110
-Estab. Elaborador N° 8675

Para asistencia técnica

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

VETLIS®
Brucella iELISA Canine (serum)

Presentations / Components

Components	Description	15-VL03-2P 2 microplates	15-VL03-5P 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 10X IgG	10X concentrated (horseradish peroxidase conjugated anti-canine IgG antibodies)	1 x 2.5 ml	1 x 6.5 ml
Substrate-chromogen solution	Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethyl-bencidine (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 concentrated	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1.2 liters)	1 x 120 y 1 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1.8 liters)
Sample diluent	Ready to use - CONTAINS PRE-SERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 120 ml	2 x 120 y 1 x 60 ml
Positive control	Serum - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.1 ml	2 x 0.1 ml
Negative control	Serum - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.1 ml	2 x 0.1 ml
Polyethylene bag	With ziplock and reusable	1	1
Instruction manual		1	1

Name and application

VETLIS®

Brucella iELISA Canines (serum)

Indirect ELISA kit for the detection of anti *Brucella canis* antibodies in canine serum.

The kit VETLIS® *Brucella* iELISA Canine is an ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) kit for the indirect detection of specific antibodies against the rough lipopolysaccharide (rLPS) of *Brucella canis* in canine serum.

Introduction

Brucellosis is a highly contagious zoonotic disease caused by Gram-negative bacteria of the genus *Brucella*. The species *Brucella canis* is the causative agent of brucellosis in dogs and also a human pathogen. *B. canis* causes abortions and stillbirths in pregnant bitches and epididymitis, orchitis and prostatitis in males. These clinical manifestations can lead to sterility, a factor that produces important economic losses in dog breeding kennels. Dogs that have been neutered do not have reproductive signs, but they occasionally develop other conditions such as ocular disease and discospondylitis. Among dogs the infection is transmitted through contaminated aborted fetuses, urine, milk, vaginal secretions and semen. Additionally, *B. canis* can spread through fomites. It has been demonstrated that uninfected dogs living with infected animals of the same sex can acquire the infection within 6 months.

The control of canine brucellosis depends primarily on the detection and separation of infected animals. The confirmatory diagnosis of brucellosis is performed directly by isolating the organism from blood and/or semen/vaginal swab culture. 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 iso-

lation, determined that the isolation of *Brucella* for diagnosis is not always feasible and effective. For this reason, the laboratory diagnosis of canine brucellosis is mainly based on the detection of specific antibodies against the infectious agent in serum samples

Principles of the technique

The VETLIS® *Brucella* iELISA Canine is an enzyme immunoassay based on the detection of IgG antibodies directed against the *Brucella canis* rough lipopolysaccharide (rLPS).

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

Kit components

- Microplate
96-well microtitre plate (12 x 8 strip wells with strip holder) coated with the antigen, sealed and stored dry.
- Wash solution
10X concentrated.
- Conjugate 10X IgG

10X concentrated (horseradish peroxidase conjugated anti-canine IgG antibodies).

-Substrate-chromogen solution

Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing hydrogen peroxide (H_2O_2)]- STORE IN THE DARK.

-Stop solution

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

-Sample diluent

Ready to use – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0.01%]. Shake well before use.

-Canine Positive Control Serum

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

-Canine Negative Control Serum

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

-Polyethylene bag

With ziplock and reusable.

-Instruction manual

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 (20, 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) 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 blank sample in duplicate in each test.

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

Reagents preparation for one microplate (96 reactions)

a. Wash solution 1X

Prepare 400 ml of 1X Wash Solution by adding 40 ml of 10X Wash Solution to 360 ml of distilled (Type II) or ultrapure (Type I) water. Sufficient volume to process one entire microplate including the dilution of the conjugate and washes. 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

Dilute 1/10 using the 1X Wash Solution. For example, to process the entire plate add 9 ml of the 1X Wash Solution and 2 ml of the 10X IgG conjugate. Homogenize very well.

Important:

-dilute the conjugate only immediately before use.

-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 for one microplate (96 reactions)

a. Positive and negative controls

In 1.5 ml tubes add 5 µl of each control to 495 µl of Sample diluent (1/100 dilution) and mix well. Add 25 µl of the above dilution to 75 µl of Sample diluent (dilution 1/4, final dilution factor of controls = 1/400) previously loaded into the corresponding wells and mix well (up and down with the micropipette at least 5 times). In each microplate the positive and negative controls are added at least in duplicate.

Important: shake the Sample diluent well before use.

b. Blank sample

On each plate a blank sample 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 1/400 using the Sample diluent. In 1.5 ml tubes add 5 µl of each sample to 495 µl of Sample diluent (1/100 dilution) and mix well. Add 25 µl of the above dilution to 75 µl of Sample diluent (dilution 1/4, final dilution factor of samples = 1/400) previously loaded into the corresponding wells and mix well (up and down with the micropipette at least 5 times).

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, 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. Process the controls (positive control, negative control and blank sample) as indicated in the 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 duplicate.

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

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

Note: Remove the liquid completely after each washing by dump and tapping onto absorbent material or aspiration with pipette. Avoid plate drying between plate washings and before adding the next reagent.

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

7. Repeat step 5.

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

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

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

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

Calculations

Expression of results

Results are expressed as the percentage of reactivity (PR) with respect to the positive control (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 1.0 (Abs450 PC > 1.0).
- The Abs450 values of the controls (PC and NC) and samples duplicates must not differ by more than 20% of the corresponding average.
- The Abs450 values of the blank sample must be less than 0.1 (Abs450 Blank sample < 0.1).
- The average Abs450 value of the NC must be less than 0,15 (Average Abs450 NC < 0.15).
- The Average Abs450 PC / Average Abs450 NC ratio must be higher than 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:

Important: respect incubation times.

Serum (dilution 1/400)

PR	Interpretation
≤ 32%	Negative
> 32% ≤ 51%	Indeterminate
> 51%	Positive

In the case of obtaining a 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/elisa-caninos.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.

Sensitivity and specificity

More than 1,300 serum samples obtained from infected animals (positive samples) and from healthy dogs (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 and the cut-off values for which a 100 % Se or Sp was achieved.

Table 1

Sensitivity, specificity and Youden's index.

Cut-off (PR) ^a	Se (%) ^b	Sp (%) ^b	J ^c
32	100 (95.1-100)	97.8 (95.0-99.3)	0.978
51	98.6 (92.6-99.9)	100 (98.4-100)	0.986

(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 of Improved Enzyme-based and Lateral Flow Immunoassays for Rapid and Accurate Serodiagnosis of Canine Brucellosis. M. E. Cortina, A. Novak, L. J. Melli, S. Elena, N. Corbera, J. E. Romero, A. M. Nicola, J. E. Ugalde D. J. Comerchi and A. E. Ciocchini. *Veterinary Microbiology* 2017 Sep;208:174-180.
- The feasibility of using antigens prepared with rough *Brucella* strains for diagnosis of canine brucellosis. G. I. Escobar, E. J. Boeri, S. M. Ayala, N. E. Lucero. *Revista Argentina de Microbiología* (2010) 42: 35-40.
- Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. N. E. Lucero, G. I. Escobar, S. M. Ayala and G. Lopez. *J. Med. Microbiol.* Vol. 51 (2002), 656–660.

For technical assistance

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

Uso veterinario

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



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