

VETSTRIP® Brucella Bovinos



Formato dipstick

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección de anticuerpos anti Brucella en muestras de suero de bovinos.

One step immunochromatographic test for the detection of anti Brucella antibodies in bovine serum.


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

00

LFIA



Bovino

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

VETSTRIP® Brucella Bovinos (suero)

Formato dipstick

Contenido

Tiras reactivas	En envoltorio trilaminado para protección de la luz y humedad	20 tiras reactivas (5 tiras por envoltorio)
Diluyente de muestra	Listo para usar en gotero plástico descartable	1 x 7 ml
Manual de instrucciones		1

Nombre y aplicación

VETSTRIP® Brucella Bovinos (suero)

Formato dipstick

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección de anticuerpos específicos contra el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* en muestras de suero de bovinos.

Gracias a la incorporación de la exclusiva tecnología **GlycoEng**, el kit posee un excelente desempeño diagnóstico, minimiza las reacciones cruzadas con otras bacterias Gram-negativas y permite diferenciar animales naturalmente infectados de aquellos vacunados con la cepa vacunal S19.

Introducción

La brucelosis es una zoonosis altamente contagiosa causada por bacterias Gram-negativas del género *Brucella*. La especie *Brucella abortus* es el agente causal de la brucelosis del ganado bovino. Esta enfermedad produce, en las hembras preñadas, abortos en períodos 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 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 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

VETSTRIP® *Brucella Bovinos* es un test inmunocromatográfico basado exclusivamente en la detección de anticuerpos del isotipo IgG dirigidos contra el polisacárido O del LPS de *Brucella*

La prueba se basa en la captura inmunológica de nanopartículas de oro recubiertas con anticuerpos de cabra anti-IgG bovina durante su paso a través de una membrana. Las inmunoglobulinas de isotipo IgG presentes en la muestra de suero reaccionan con las partículas de oro funcionalizadas con los anticuerpos anti-IgG bovina y los complejos formados

migran por cromatografía hacia la zona de reacción. En esta zona se ha inmovilizado el antígeno (glicoproteína recombinante purificada) y anticuerpos anti-IgG de cabra en las líneas de ensayo (TL) y control (CL), respectivamente.

Si la muestra contiene anticuerpos IgG dirigidos contra el polisacárido O de Brucella, los complejos nanopartícula-anticuerpo son capturados por el antígeno inmovilizado en la membrana lo cual se visualiza como una banda de color rosa/rojo. Independientemente de la presencia en la muestra de anticuerpos IgG anti polisacárido O de Brucella, los complejos que no fueron capturados en la TL continúan migrando y son capturados en la CL por los anticuerpos anti-IgG de cabra dando origen también a la formación de una banda de color rosa/rojo. La aparición de la línea de control indica que la cromatografía se ha desarrollado correctamente y en condiciones que aseguran la reacción antígeno-anticuerpo.

Componentes del kit

-Tiras reactivas en formato dipstick

Tiras reactivas en envoltorio trilaminado sellado con sobres de sílica gel en su interior para protección de la luz y humedad.

-Diluyente de muestra (gotero con 7 ml)

Listo para usar.

-Manual de instrucciones

Almacenamiento y vencimiento

Conservar a temperatura ambiente entre 15 y 25°C.

Temperatura de transporte: 15 a 25°C.

Mantener las tiras reactivas en su envoltorio original herméticamente cerrado y con desecante para proteger las tiras de la luz y la humedad.

La conservación correcta de todos los componentes del kit permitirá el uso del mismo hasta la fecha de caducidad.

Vencimiento: 12 meses.

No utilizar componentes de diferentes lotes o después de la fecha de venci-

miento.

Materiales necesarios no incluidos en el kit

-Cronómetro.

-Tubos de vidrio tipo Khan o placas de 96 pocillos con fondo plano.

-Micropipeta.

-Puntas de micropipeta.

Precauciones de uso

1. Leer atentamente y seguir todas las instrucciones de uso ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el Manual de instrucciones del kit.

2. Conservar el kit y todos sus componentes a temperatura ambiente (15-25°C).

3. Mantener las tiras reactivas en su envoltorio original con desecante y herméticamente cerrado para protegerlas de la luz y la humedad.

4. Sacar las tiras de su envoltorio original solo inmediatamente antes de usarlas.

5. Manipular todos los reactivos y materiales siguiendo la Buenas Prácticas de Laboratorio.

6. Las muestras de suero deben considerarse potencialmente infecciosas y, por lo tanto, los componentes del kit que las contactan deben manipularse con guantes y descartarse como residuo patológico según normativa legal vigente. El resto de los componentes del kit no representan ningún daño potencial a la salud o al medio ambiente.

7. No usar el kit pasada la fecha de caducidad o si los componentes no fueron conservados en las condiciones indicadas arriba.

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

Reactivos y muestras

Diluyente de Muestra

Listo para usar en gotero de plástico descartable.

Muestras de suero

Pueden analizarse sueros 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 conservar 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 contaminadas y/o en mal estado pueden producir resultados erróneos.

Instrucciones de uso (ver Figura 1)

1. En un tubo de vidrio tipo Khan o una placa de 96 pocillos agregar 4 gotas de Diluyente de muestra (aproximadamente 100 µl).
2. Agregar al tubo o placa 5 µl de suero (previamente dejar que las muestras alcancen la temperatura ambiente). Homogeneizar.
3. Tomar una tira reactiva por la parte superior (color violeta) y colocarla en forma vertical en el tubo o la placa siguiendo la orientación de las flechas impresas sobre la tira reactiva. Cerrar con cinta adhesiva el sobre conteniendo el resto de las tiras.
4. Esperar 10 minutos, leer e interpretar el resultado de la prueba.

Interpretación de los resultados y criterios de validez (ver Figura 1)

Resultado positivo del ensayo: cuando se observan dos bandas de color rosa/rojo. Una correspondiente a la línea de ensayo (TL) y la otra a la línea de control (CL).

Nota: independientemente de la intensidad de color de la TL el resultado debe considerarse positivo.

Resultado negativo del ensayo: cuando sólo se observa una banda de color rosa/rojo correspondiente a la línea de control (CL).

Resultado inválido: cuando no se observan bandas o cuando solo se observa una banda correspondiente a la línea de

ensayo (TL). En este caso la prueba debe repetirse ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el Manual de instrucciones del kit.

Toda línea que pueda aparecer pasados los 10 minutos no tendrá valor diagnóstico.

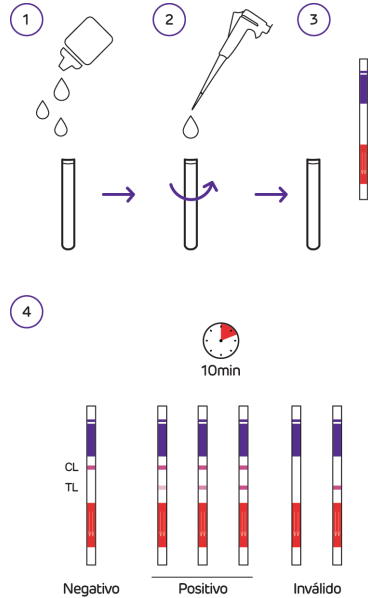


Figura 1: Instrucciones de uso e interpretación de los resultados.

Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Para determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo, se analizaron muestras de suero obtenidas de animales vacunados con la cepa S19 y provenientes de establecimientos libres de brucelosis (muestras negativas) y de animales serológicamente positivos por BPA, CELISA, FPA y CFT* (muestras positivas).

El grupo de muestras negativas incluyó muestras serológicamente negativas para todas las pruebas (BPAT, CELISA, FPA y CFT) como así también muestras

positivas por BPAT pero negativas para el resto de las pruebas (CELISA, FPA y CFT).

A partir de los resultados obtenidos se calculó la sensibilidad y especificada diagnóstica del ensayo:

Sensibilidad = 97%

Especificidad = 100%

*BPAT, ensayo de aglutinación en placa; CELISA, ELISA competitivo; FPA, ensayo de polarización de fluorescencia; CFT, ensayo de fijación de complemento.

Referencias

-Ciocchini, AE; Rey Serantes, DA; Melli, LJ; Guidolin, LS; Iwashkiw, J; Elena, S; Franco, C; Nicola, AM; Feldman, MF; Comerci, 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., 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.

VETSTRIP® Brucella Bovine (serum)

Dipstick format

Kit components

<i>Strips</i>	In sealed tri-laminated pouch to protect the strips from light and moisture	20 strips (5 strips per pouch)
<i>Sample diluent</i>	Ready to use in plastic dropper bottle	1 x 7 ml
<i>Instruction manual</i>		1

Name and application

VETSTRIP® Brucella Bovine (serum)

Dipstick format

One step immunochromatographic test for the detection of specific antibodies against the O polysaccharide of the lipopolysaccharide (LPS) of Brucella in bovine serum.

Thanks to its exclusive **GlycoEng** technology, the kit has an excellent diagnostic performance, minimizes cross-reaction with other Gram-negative bacteria and allows to differentiate naturally infected animals from those vaccinated with the vaccine strain S19.

Introduction

Brucellosis is a highly contagious zoonotic disease caused by Gram-negative bacteria of the genus Brucella. The species Brucella abortus is the 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. 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 vaccination with the 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.

Principle of the technique

The VETSTRIP® Brucella Bovine is an immunochromatographic test based on the detection of IgG antibodies directed against the O polysaccharide of the LPS of Brucella.

The test is based on the immunological capture of gold nanoparticles coated with goat anti-bovine IgG antibodies during its passage through a membrane. The IgG isotype immunoglobulins present in the serum sample react with gold particles functionalized with anti-bovine IgG antibodies and the formed complexes migrate by chromatography to the reaction zone. In this area, the antigen (purified recombinant glycoprotein) and donkey anti-goat IgG antibodies were immobilized in the test (TL) and control lines (CL), respectively. If the sample contains bovine IgG antibodies directed against the O polysaccharide of Brucella, the nanoparticle-antibody complexes are captured by the antigen immobilized on the membrane (TL) which is visualized as a pink/red band. Regardless of the presence in the sample of IgG antibod-

ies anti-Brucella O polysaccharide, the complexes that were not captured in the TL continue to migrate and are captured in the CL by the anti-goat IgG antibodies, leading also to the formation of a pink/red band. The appearance of the control line indicates that the chromatography has been developed correctly and under conditions that ensure the antigen-antibody reaction.

Kit components

-Strips in dipstick format

Reactive strips in sealed tri-laminated pouch with silica gel packets inside to protect them from light and moisture.

-Sample diluent (dropper bottle with 7 ml)

Ready to use.

-Instruction manual

Storage and expiration

Store at room temperature between 15 and 25°C.

Transport temperature: 15 to 25°C.

Keep the strips in their original packaging with the silica packets and hermetically sealed to protect them from light and moisture.

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

-Timer.

-Khan test tubes or flat bottom 96-well microtitre plates.

-Micropipette.

-Micropipette tips.

Precautions

1- Carefully read and strictly follow all instructions detailed in the manual included in the kit.

2- Store the kit and all reagents at room temperature (15-25°C).

3- Keep the strips in their original packaging with the silica packets and hermetically sealed to protect them from light and moisture.

4- Remove the strips from its pouch only immediately before using it.

5- Handle all materials and reagents according to the Good Laboratory Practices.

6- Serum samples 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 rest of the kit components does not represent any potential risk for health and the environment.

7- Do not use the kit beyond expiration date or if the kit components were not kept in the conditions indicated above.

8- Do not mix components or instruction manuals from different test kits batches.

Reagents and samples

-Sample diluent

Ready to use in plastic dropper bottle.

-Serum 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. Samples contaminated and/or not well conserved may produce erroneous results.

Instructions for the analysis (see Figure 1)

1. Dispense 4 drops of Sample diluent (approximately 100 µl).

2. Add to the tube or plate 5 µl of serum sample (previously allow the samples equil-

ibrate to room temperature). Homogenize.

- Take one test strip from the top (violet color) and place it vertically on the tube or plate following the orientation of the arrows printed on the test strip. Close the envelope containing the remaining strips with adhesive tape.
- Wait 10 minutes, read and interpret the test result.

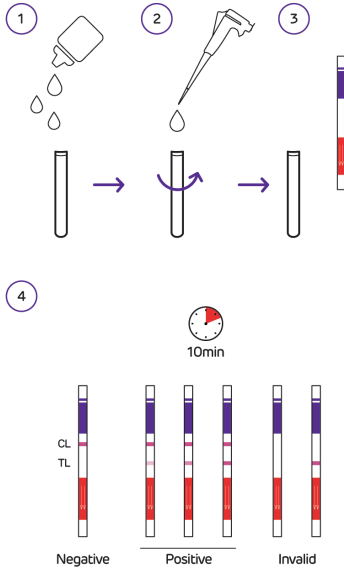


Figure 1: Instructions for the analysis and interpretation of results.

Interpretation of results and validity criteria of the test (see Figure 1)

Positive test result: when two pink/red bands are observed. One corresponding to the test line (TL) and the other corresponding to the control line (CL).

Note: regardless of the color intensity of the TL the result should be considered positive.

Negative test result: when only one pink/red band corresponding to the control line (CL) is observed.

Invalid result: when no bands are observed or when only one band corre-

sponding to the test line (TL) is observed. In this case, the test must be repeated in strict accordance with the procedure detailed in the kit's Instruction manual.

Any line that may appear after the 10 minutes will not have diagnostic value.

Sensitivity and specificity

To determine the diagnostic sensitivity and specificity of the assay, serum samples obtained from animals vaccinated with strain S19 and establishments free of brucellosis (negative samples), and from serologically positive animals by BPA, CELISA, FPA and CFT* (positive samples) were analyzed.

The group of negative samples included serologically negative samples for all tests (BPAT, CELISA, FPA and CFT*) as well as positive samples by BPAT but negative for the rest of the tests (CELISA, FPA and CFT).

Based on the obtained results, the diagnostic sensitivity and specificity of the assay were calculated:

Sensitivity = 97%

Specificity = 100%

*BPAT, buffered plate agglutination assay; CELISA, competitive ELISA; FPA, fluorescence polarization assay; CFT, complement fixation test.

References

-Ciocchini, AE; Rey Serantes, DA; Melli, LJ; Guidolin, LS; Iwashkiw, J; Elena, S; Franco, C; Nicola, AM; Feldman, MF; Comerci, 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., 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.

00

LFIA



Bovino

 Chemtest S.A.

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