



**República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional**  
Las Malvinas son argentinas

**Disposición**

**Número:**

**Referencia:** EX-2021-85838687-APN-DGA#ANMAT

---

VISTO el N° EX-2021-85838687-APN-DGA#ANMAT del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma **CHEMTEST ARGENTINA S.A.** solicita autorización para la venta de los Productos médicos para diagnóstico *in vitro* denominados: 1) **CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA**; 2) **CHEMLIS® Brucella canis iELISA**.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia y corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM de los productos médicos para diagnóstico *in vitro* objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE

## MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

### DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de los productos médicos para diagnóstico *in vitro*: **1) CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA; 2) CHEMLIS® Brucella canis iELISA** de acuerdo con lo solicitado por CHEMTEST ARGENTINA S.A., con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulos y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2022-113808086-APNINPM#ANMAT y IF-2022-113808158-APN-INPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM 2360-3”, con exclusión de toda otra leyenda no autorizada y/o contemplada en la normativa vigente.

ARTÍCULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica a los nuevos productos. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

### DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

**NOMBRE COMERCIAL:** 1) CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA; 2) CHEMLIS® Brucella canis iELISA.

**MODELO:** 1) REF: 15-CL02, 2) REF: 15-CL03.

**INDICACIÓN DE USO:** 1) El kit CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA es un ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto y recombinante para la detección de anticuerpos IgG específicos contra el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis* en muestras de suero o plasma obtenido con heparina, citrato de sodio o EDTA; 2) El kit CHEMLIS® Brucella canis iELISA es un kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto para la detección de anticuerpos IgG específicos contra el lipopolisacárido rugoso (LPSr) de *Brucella canis* en muestra de suero o plasma obtenido con heparina, citrato de sodio o EDTA.

**FORMA DE PRESENTACIÓN:** 1) REF: 15-CL02 y 2) REF: 15-CL03: Envases por 192 o 384 determinaciones conteniendo:

Componentes	REF:15-CL02-2P	REF:15-CL02-4P
	REF:15-CL03-2P	REF:15-CL03-4P

	2 placas por 192 determinaciones	4 placas por 384 determinaciones
Microplaca de análisis	2 microplacas con 96 pocillos (12 strips x 8 pocillos con marco) cada una	4 microplacas con 96 pocillos (12 strips x 8 pocillos con marco) cada una
Conjugado Liofilizado	2 unidades	4 unidades
Solución sustrato-cromógeno	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de frenado	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de lavado	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)
Diluyente de muestra	2 x 120 ml	3 x 120 ml
Control positivo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Control negativo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Bolsa de polietileno	1 unidad	1 unidad

**PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN:** 1) y 2): 12 (DOCE) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre 2 y 8°C.

**NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE:** CHEMTEST ARGENTINA S.A., Av. 25 de Mayo 1021, Edificio de la Fundación Argentina de Nanotecnología, San Martín, Buenos Aires (ARGENTINA).

**CONDICIÓN DE USO/CATEGORÍA:** USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Nº EX-2021-85838687-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by GARAY Valéria Teresa  
Date: 2022.11.02 09:53:34 ART  
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by Gestion Documental  
Electronica  
Date: 2022.11.02 09:53:48 -03:00



**República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional**  
Las Malvinas son argentinas

**Certificado - Redacción libre**

**Número:**

**Referencia:** EX-2021- 85838687-APN-DGA#ANMAT

---

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN

PRODUCTOS MEDICOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

Nº EX-2021- 85838687-APN-DGA#ANMAT

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que, de acuerdo con lo solicitado por la firma **CHEMTEST ARGENTINA S.A.**, se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de los nuevos productos médicos para diagnóstico in vitro con los siguientes datos identificatorios característicos:

**NOMBRE COMERCIAL:** 1) CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA; 2) CHEMLIS® Brucella canis iELISA.

**MODELO:** 1) REF: 15-CL02, 2) REF: 15-CL03.

**INDICACIÓN DE USO:** 1) El kit CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA es un ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto y recombinante para la detección de anticuerpos IgG específicos contra el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de Brucella abortus, Brucella melitensis y Brucella suis en muestras de suero o plasma obtenido con heparina, citrato de sodio o EDTA; 2) El kit CHEMLIS® Brucella canis iELISA es un kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto para la detección de anticuerpos IgG específicos contra el lipopolisacárido rugoso (LPSr) de Brucella canis en muestra de suero o plasma obtenido con heparina, citrato de sodio o EDTA.

**FORMA DE PRESENTACIÓN:** 1) REF: 15-CL02 y 2) REF: 15-CL03: Envases por 192 o 384 determinaciones conteniendo:

Componentes	<b>REF:15-CL02-2P</b>	<b>REF:15-CL02-4P</b>
	<b>REF:15-CL03-2P</b> 2 placas por 192 determinaciones	<b>REF:15-CL03-4P</b> 4 placas por 384 determinaciones
Microplaca de análisis	2 microplacas con 96 pocillos (12 strips x 8 pocillos con marco) cada una	4 microplacas con 96 pocillos (12 strips x 8 pocillos con marco) cada una
Conjugado Liofilizado	2 unidades	4 unidades
Solución sustrato-cromógeno	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de frenado	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de lavado	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)
Diluyente de muestra	2 x 120 ml	3 x 120 ml
Control positivo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Control negativo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Bolsa de polietileno	1 unidad	1 unidad

**PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN:** 1) y 2): 12 (DOCE) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre 2 y 8°C.

**NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE:** CHEMTEST ARGENTINA S.A., Av. 25 de Mayo 1021, Edificio de la Fundación Argentina de Nanotecnología, San Martín, Buenos Aires (ARGENTINA).

**CONDICIÓN DE USO/CATEGORÍA:** USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del **PRODUCTO MÉDICO PARA**

**DIAGNÓSTICO IN VITRO PM 2360-3.**

Nº EX-2021- 85838687-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by Gestion Documental Electronica  
Date: 2022.11.02 10:07:36 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental  
Electronica  
Date: 2022.11.02 10:07:36 -03:00

## CHEMLIS® Brucella canis iELISA

### Rótulos externos e internos

#### Presentación 2 microplacas (REF: 15-CL03-2P)

#### Rótulos externos

A) Principal (arriba) (166 mm x 95 mm): etiqueta principal con la denominación, números de referencia y lote, número de determinaciones, fecha de vencimiento y temperatura de conservación.



**CHEMLIS®**  
**Brucella canis iELISA**

Kit para la detección de anticuerpos anti Brucella canis en muestras de suero y plasma de humanos  
*Kit for the detection of antibodies against Brucella canis in human serum and plasma*

Autorizado por ANMAT PM 2360-03

Validado por  ANLIS MALBRÁN  
 UNSAM

**IVD** Diagnóstico in vitro / In vitro diagnostics










 ELISA	 Humanos	<b>REF</b> 15-CL03-2P <b>LOT</b> 15-CL03/2003-1	 192  03/2021	20°C  8°C 
--	--	--	--	---

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

B) Etiqueta lateral (140 mm x 80 mm): tabla con los logos que se usan y su significado en español e inglés.

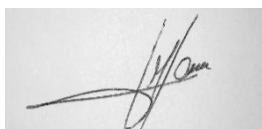




CHEMLIS®	
Símbolo / Symbol	
	Fecha de vencimiento / Expiration date
	Número de catálogo / Catalog number
	Lote / Batch code
	Para diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use only
	Límites de temperatura / Temperature limits
	Consultar instrucciones para su uso / See instructions for use
	Número de determinaciones / Number of determinations
	Fabricante / Manufacturer
	Riesgo biológico / Biological risks

**C) Etiqueta lateral (140 mm x 80 mm):** tabla con los componentes del kit según presentación en español e inglés.

esp			eng		
CHEMLIS® Brucella canis iELISA			CHEMLIS® Brucella canis iELISA		
Componentes / Presentaciones			Kit components / Presentations		
Componentes	REF: 15-CL03-2P	REF: 15-CL03-4P	Components	REF: 15-CL03-2P	REF: 15-CL03-4P
Microplaca de análisis	2 microplacas (192 deter.)	4 microplacas (384 deter.)	Microplates	2 microplates (192 tests)	4 microplates (384 tests)
Conjugado	2 unidades	4 unidades	Conjugate	2 units	4 units
Solución sustrato-cromógeno	1 x 30 ml	1 x 60 ml	Substrate-chromogen solution	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de frenado	1 x 30 ml	1 x 60 ml	Stop solution	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de lavado	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	Wash solution	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 liters)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 liters)
Diluyente de muestra	2 x 120 ml	3 x 120 ml	Sample diluent	2 x 120 ml	3 x 120 ml
Control positivo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml	Positive control	1 x 0.1 ml	1 x 0.1 ml
Control negativo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml	Negative control	1 x 0.1 ml	1 x 0.1 ml
Bolsa de polietileno	1 unidad	1 unidad	Polyethylene bag	1 unit	1 unit
Manual de instrucciones	1 unidad	1 unidad	Instruction manual	1 unit	1 unit




### Rótulos externos

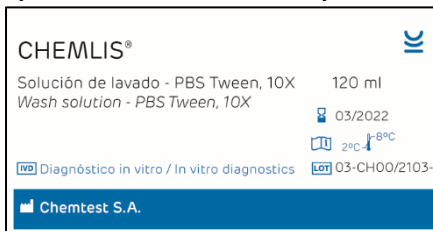
#### A) CONTROLES (35 mm x 20 mm):



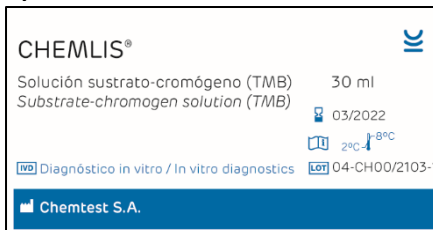
#### B) CONJUGADO (58 mm x 30 mm): x2



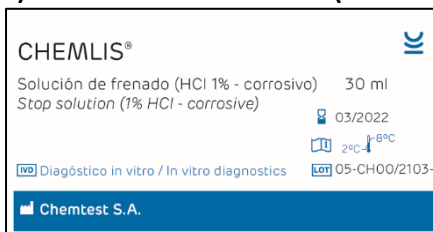
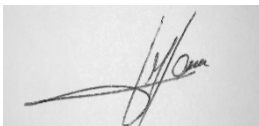
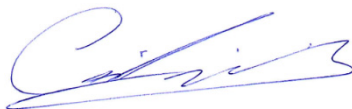
#### C) SOLUCION DE LAVADO (58 mm x 30 mm):



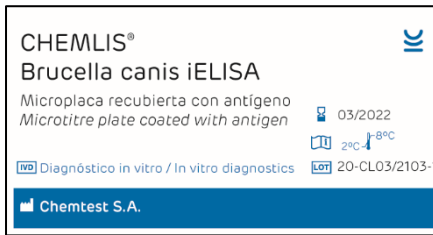
#### D) SOLUCION SUSTRATO-CROMOGENO (58 mm x 30 mm):



#### E) SOLUCION DE FRENADO (58 mm x 30 mm):

**F) MICROPLACA (58 mm x 30 mm): x2**



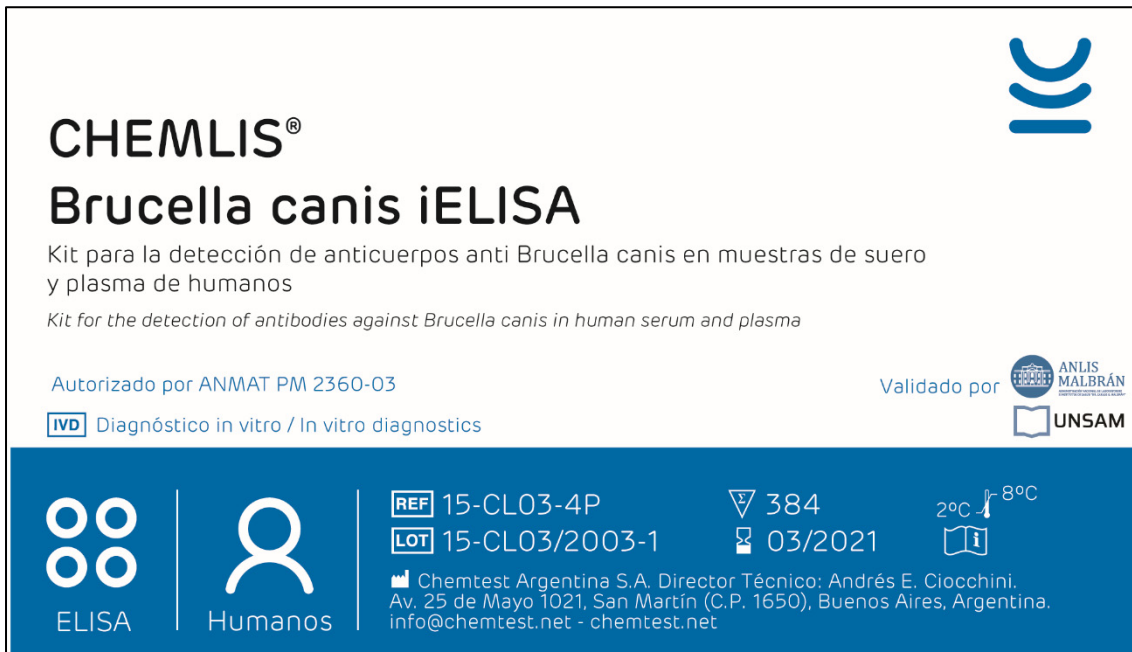
**G) DILUYENTE DE MUESTRA (58 mm x 30 mm): x 2**



**-Presentación 4 microplacas (REF: 15-CL03-2P)**



**Rótulos externos**

**A) Principal (arriba) (166 mm x 95 mm): etiqueta principal con la denominación, números de referencia y lote, número de determinaciones, fecha de vencimiento y temperatura de conservación.**





**CHEMLIS®**  
**Brucella canis iELISA**


Kit para la detección de anticuerpos anti Brucella canis en muestras de suero y plasma de humanos  
*Kit for the detection of antibodies against Brucella canis in human serum and plasma*

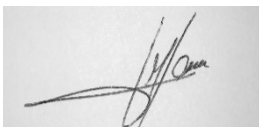
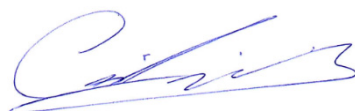
Autorizado por ANMAT PM 2360-03  
Validado por  ANLIS MALBRÁN  
 UNSAM

**IVD** Diagnóstico in vitro / In vitro diagnostics








 ELISA |  Humanos

**REF** 15-CL03-4P      **▽** 384  
**LOT** 15-CL03/2003-1      **📅** 03/2021      **📖** 2°C - 8°C

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

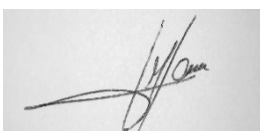
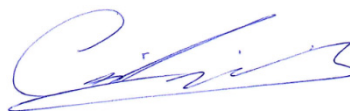



**B) Etiqueta lateral (140 mm x 80 mm):** tabla con los logos que se usan y su significado en español e inglés.

CHEMLIS®		
Símbolo / Symbol		
	Fecha de vencimiento / Expiration date	
<b>REF</b>	Número de catálogo / Catalog number	
<b>LOT</b>	Lote / Batch code	
<b>IVD</b>	Para diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use only	
	Límites de temperatura / Temperature limits	
	Consultar instrucciones para su uso / See instructions for use	
	Número de determinaciones / Number of determinations	
	Fabricante / Manufacturer	
	Riesgo biológico / Biological risks	

**C) Etiqueta lateral (140 mm x 80 mm):** tabla con los componentes del kit según presentación en español e inglés.

esp CHEMLIS® Brucella canis iELISA Componentes / Presentaciones			eng CHEMLIS® Brucella canis iELISA Kit components / Presentations		
Componentes	REF: 15-CL03-2P	REF: 15-CL03-4P	Components	REF: 15-CL03-2P	REF: 15-CL03-4P
Microplaca de análisis	2 microplacas (192 deter.)	4 microplacas (384 deter.)	Microplates	2 microplates (192 tests)	4 microplates (384 tests)
Conjugado	2 unidades	4 unidades	Conjugate	2 units	4 units
Solución sustrato-cromógeno	1 x 30 ml	1 x 60 ml	Substrate-chromogen solution	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de frenado	1 x 30 ml	1 x 60 ml	Stop solution	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de lavado	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	Wash solution	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 liters)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 liters)
Diluyente de muestra	2 x 120 ml	3 x 120 ml	Sample diluent	2 x 120 ml	3 x 120 ml
Control positivo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml	Positive control	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Control negativo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml	Negative control	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Bolsa de polietileno	1 unidad	1 unidad	Polyethylene bag	1 unit	1 unit
Manual de instrucciones	1 unidad	1 unidad	Instruction manual	1 unit	1 unit

## Rótulos internos

### A) CONTROLES (35 mm x 20 mm):



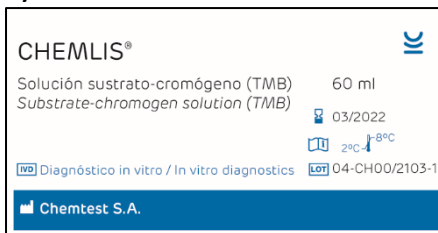
### B) CONJUGADO (58 mm x 30 mm): x4



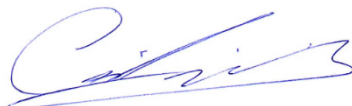
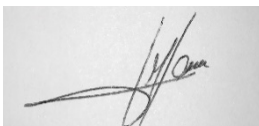
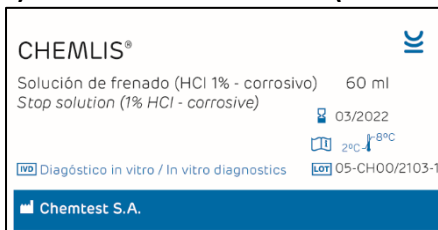
### C) SOLUCION DE LAVADO (58 mm x 30 mm): x2



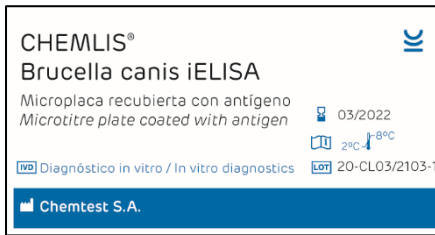
### D) SOLUCION SUSTRATO-CROMOGENO (58 mm x 30 mm):



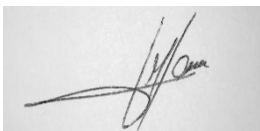
### E) SOLUCION DE FRENADO (58 mm x 30 mm):



**F) MICROPLACA (58 mm x 30 mm): x4**



**G) DILUYENTE DE MUESTRA (58 mm x 30 mm): x3**



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Ciochini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

# CHEMLIS® Brucella canis iELISA



Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti Brucella canis en muestras de suero y plasma de humanos.

*Indirect ELISA kit for the detection of anti Brucella canis antibodies in human serum and plasma*

Juan Manuel Capece  
Presidente

Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

Autorizado por ANMAT PM 2360-03



ELISA



Humanos



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

**CHEMLIS®**  
**Brucella canis iELISA**

Componentes / Presentaciones

Componentes	Descripción	15-CLO3-2P Preentación 2 placas	15-CL03-4P Preentación 4 placas
Microplaca de análisis	Microplacas de 96 pocillos (12 strips x 8 pocillos con marco) recubiertas con el antígeno, selladas y almacenadas en seco	2 microplacas (192 determinaciones)	4 microplacas (384 determinaciones)
Conjugado	Liofilizado (anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano)	2 unidades	4 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)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)
Diluyente de muestra	Listo para usar - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0,01%]	2 x 120 ml	3 x 120 ml
Control positivo	Suero inactivado - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0,01%]	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Control negativo	Suero inactivado - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0,01%]	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Bolsa de polietileno	Con cierre hermético. Reutilizable.	1 unidad	1 unidad
Manual de instrucciones		1 unidad	1 unidad



## Nombre y aplicación

CHEMLIS®

*Brucella canis* iELISA

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

El kit CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA es un kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto para la detección de anticuerpos IgG específicos contra el lipopolisacárido rugoso (LPSr) de *Brucella canis* en muestra de suero o plasma obtenido con heparina, citrato de sodio o EDTA. Gracias a la incorporación de la exclusiva tecnología Pure-R, el kit posee un excelente desempeño diagnóstico. CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA puede usarse como test de screening (tamizaje) y/o confirmatorio.

## Introducción

La brucelosis es una zoonosis altamente contagiosa causada por bacterias Gram-negativas del género *Brucella*. Convencionalmente se clasifica a las especies del género *Brucella* según la presencia o no del antígeno O en el lipopolisacárido (LPS) de superficie. Las especies lisas (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) expresan la forma completa del lipopolisacárido (lipopolisacárido liso, LPSs); en cambio, las especies rugosas (*B. canis* y *B. ovis*) no expresan el antígeno O en la membrana externa presentando la forma incompleta del LPS de superficie (lipopolisacárido rugoso, LPSr). *Brucella canis*, agente etiológico de la brucelosis en perros, es la única especie de *Brucella* con LPS rugoso capaz de infectar humanos y producir la enfermedad.

El diagnóstico confirmatorio de brucelosis se realiza en forma directa mediante el aislamiento del microorganismo a partir de muestras de sangre principalmente u otros tejidos. Sin embargo, debido al crecimiento lento de *Brucella canis* 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 *B. canis* no siempre sea factible y eficaz. Por estos motivos, el diagnóstico de laboratorio de brucelosis por *B. canis* se basa principalmente en el diagnóstico serológico mediante la detección de anticuerpos específicos contra el LPSr de *B. canis* en muestras de suero.

## Principio de la técnica

El kit CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA es un ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida basado en la detección de anticuerpos IgG específicos contra el lipopolisacárido rugoso (LPSr) de *Brucella canis* en muestra de suero y plasma. En este ensayo los anticuerpos presentes en la muestra reaccionan con el LPSr (purificado mediante la exclusiva tecnología Pure-R) que recubre los pocillos. Si la muestra contiene anticuerpos contra el LPSr de *B. canis*, estos se unen al pocillo. Al añadir los anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), se forma un complejo con los anticuerpos IgG unidos al antígeno. 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 y 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.



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

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).
- 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, 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 representan ningún riesgo potencial para la salud y el medio ambiente.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **a. Solución de lavado 1X**

Llevar la Solución de lavado concentrada 10X a temperatura ambiente (20- 25°C) y agitar muy bien para garantizar la completa disolución de posibles precipitados.

La Solución de lavado concentrada 10X debe diluirse 1/10 con agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I); por ejemplo, agregando 30 ml de Solución de lavado 10X a 270 ml de agua (cantidad suficiente de Solución de lavado 1X para procesar una microplaca: 10 ml para reconstituir el conjugado IgG y el resto para 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.



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

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. Preparar inmediatamente 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).

La solución de conjugado sobrante se puede alícuotar en tubos tipo eppendorf y conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  (no se puede conservar en el refrigerador) durante un tiempo máximo de 3 meses. En este período de tiempo cada alícuota se puede congelar y descongelar una sola vez.

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

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

Los controles (CP y CN) deben diluirse 1:400 utilizando el Diluyente de muestra.

Agregar 2  $\mu\text{l}$  del control correspondiente a 800  $\mu\text{l}$  de Diluyente de muestra (dilución 1:400) y mezclar bien. Usar 100  $\mu\text{l}$  de cada control diluido por pocillo y por duplicado.

#### 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  $\mu\text{l}$  por pocillo del Diluyente de muestra.

### Preparación de las muestras

Las muestras deben diluirse 1:400 utilizando el Diluyente de muestra.

Agregar 2  $\mu\text{l}$  de suero a 800  $\mu\text{l}$  de Diluyente de muestra (dilución 1:400) y mezclar bien. Usar

100  $\mu\text{l}$  de la muestra diluida por pocillo.

Notas:

-Se recomienda analizar muestras de suero o plasma (obtenidas con heparina, citrato de sodio o EDTA como anticoagulante) recientemente obtenidas (frescas) y libres de turbidez.

-Si las muestras contienen partículas o un alto contenido de triglicéridos deberán clarificarse mediante centrifugación.

-Si las muestras no se analizan en forma inmediata estas se pueden conservar refrigeradas en la heladera ( $2$  a  $8^{\circ}\text{C}$ ) hasta 72 hs. Para una conservación más prolongada conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $-15$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) teniendo en cuenta que durante la conservación y como consecuencia del proceso de congelado y descongelado el título de anticuerpos puede cambiar y producir resultados erróneos. Si las muestras se congelan, estas se deben descongelar totalmente, homogeneizar y centrifugar antes de realizar el análisis.

-Se recomienda analizar las muestras al menos por duplicado.

-Las muestras contaminadas y/o en mal estado pueden producir resultados erróneos.

### Procedimiento de la prueba

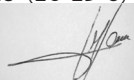
1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente ( $20$ - $25^{\circ}\text{C}$ ). No retirar la placa de su envoltorio hasta que la misma haya alcanzado la temperatura ambiente. Si no se utiliza toda la placa, separar únicamente los strips de 8 pocillos necesarios para analizar los controles y las muestras. Guardar el resto de los strips, junto con los desecantes, en la bolsa de polietileno con cierre hermético incluida en el kit y volver a almacenar en el refrigerador ( $2$ - $8^{\circ}\text{C}$ ).

Nota: una vez abierto el envoltorio original de la placa los strips se pueden conservar en la bolsa de polietileno herméticamente cerrada y con los desecantes, y en el refrigerador ( $2$ - $8^{\circ}\text{C}$ ) hasta 4 meses mientras no supere la fecha de vencimiento indicada en la caja.

2. Agregar por duplicado 100  $\mu\text{l}$  por pocillo del control positivo, control negativo y blanco de muestra. Ver ítem-Preparación de los controles.

3. Agregar 100  $\mu\text{l}$  por pocillo de cada muestra. Ver ítem-Preparación de las muestras.

4. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente ( $20$ - $25^{\circ}\text{C}$ ) con agitación



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

orbital suave durante 1 hora.

5. Lavar 5 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 del Conjugado a cada pocillo. Ver ítem-Preparación del conjugado. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

7. Repetir el paso 5.

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

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

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

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

**Importante:** respetar los tiempos de incubación.

## Cálculos

### Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de reactividad (PR) con respecto

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

$$PR_{Muestra} = \frac{Abs_{450} \text{ Muestra}^*}{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CP}} \times 100$$

\*  $Abs_{450}$  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  $Abs_{450}$  del CP debe ser mayor a 1,2 (Promedio  $Abs_{450}$  CP > 1,2).
- Los valores de  $Abs_{450}$  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  $Abs_{450}$  del Blanco de muestra (Blc Mtra) deben ser inferiores a 0,1 ( $Abs_{450}$  Blc Mtra < 0,1).
- El valor promedio de la  $Abs_{450}$  del CN debe ser menor a 0,15 (Promedio  $Abs_{450}$  CN < 0,15).
- La relación Promedio  $Abs_{450}$  CP / Promedio  $Abs_{450}$  CN debe ser mayor a 8 (Promedio  $Abs_{450}$  CP / Promedio  $Abs_{450}$  CN > 8).

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:

Muestra (dilución 1:400)

PR	Interpretación
≤ 45%	No Reactivo
> 45 ≤ 60%	Indeterminado
> 60%	Reactivo

En caso de obtener un resultado "Inde-



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

terminado" la prueba se debe repetir con la misma muestra. Si el resultado es todavía indeterminado, se recomienda ensayar una segunda muestra 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.

## Evaluación de desempeño

### Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Para determinar la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) diagnóstica del ensayo, se analizaron más de 600 muestras de suero obtenidas de pacientes con diagnóstico de brucelosis causada por *B. canis* y de individuos sanos. A partir de los resultados obtenidos con estas muestras se realizó un ensayo por curvas ROC (receiver-operating-analysis). Este análisis permitió determinar el valor de corte que maximiza simultáneamente la Se y Sp (45%) y el valor de corte para el cual la Sp es del 100% (60%).

**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>
45	100 (93,6 - 100)	99,6 (98,7 - 99,9)	0,996
60	87,5 (75,9 - 94,8)	100 (99,3 - 100)	0,875

(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).

### Efecto hook

A partir del análisis de muestras con altos títulos de anticuerpos específicos anti *Brucella* se determinó que el kit

CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA no presenta efecto hook en la detección de anticuerpos IgG.

### Reactividad cruzada

La reactividad cruzada de CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA se evaluó analizando muestras con serología positiva obtenidas de pacientes con las siguientes enfermedades o infecciones bacterianas, parasitarias y virales:

-Bacterianas: infección por *Escherichia coli* O157, O145 y O121, Tuberculosis, Sífilis, infección por *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*.

-Virales: Dengue, VHB, VHC, HTLV I/II, HIV, Hantavirus.

-Parasitarias: Chagas, Leishmaniasis y Toxoplasmosis.

-Enfermedades autoinmunes: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y vasculitis autoinmune.

CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA presenta un alto nivel de especificidad ya que no se observó reactividad cruzada con excepción de 1 muestra de 9 obtenidas de pacientes con enfermedades autoinmunes, 1 de 5 de pacientes con sífilis y 1 de 9 de pacientes con Toxoplasmosis. Sin embargo, es importante destacar que, en estudios previos de seroprevalencia realizados en nuestro laboratorio con más de 800 muestras obtenidas en bancos de sangre, hemos observado una seroprevalencia poblacional de anticuerpos anti-*B. canis* del 5%. Por lo tanto, en estos tres casos donde observamos reactividad cruzada no podemos descartar una infección actual o previa por *B. canis* lo que explicaría el resultado positivo obtenido con el kit CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA.

### Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias potencialmente interferentes no tienen ningún impacto en el desempeño de CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA (las concentraciones de prueba finales de las sustancias interferentes se indican entre paréntesis):



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

-Ácido oxálico (0,6 mg/ml), Albumina bovina (20 mg/ml), Inmunoglobulina G Humana (hlgG) (2 mg/ml), Inmunoglobulina M Humana (hlgG) (2 mg/ml), Inmunoglobulina A Humana (hlgG) (2 mg/ml), Colesterol (5 mg/ml), Hemoglobina (10 mg/ml) y Bilirrubina (2 mg/ml).

#### *Repetibilidad y reproducibilidad*

La repetibilidad y reproducibilidad de CHEMLIS® Brucella canis iELISA se estableció utilizando paneles de referencia internos que contienen muestras negativas y una variedad de muestras positivas. No se observaron diferencias dentro de las evaluaciones, entre evaluaciones, entre lotes, entre sitios y entre días.

#### **Advertencias**

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

#### **ANMAT**

-Autorizado por ANMAT PM 2360-03. Chemtest Argentina S.A. Legajo N° 2360.  
-Director Técnico: Andrés E. Ciocchini.

#### **Para Asistencia Técnica / For technical assistance**

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

#### **Referencias**

-Serantes, D. R., Cortina, E., Novak, A., Wallach, J., Ugalde, J. E., Ciocchini, A. E., and Comerci, D. (2018). Development of high-performance immunoassay for Brucella canis and seroprevalence survey in humans and dogs of Buenos Aires urban area. International Journal of Infectious Diseases, 73, 387. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.4290>.



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Ciocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

**CHEMLIS®**  
**Brucella canis iELISA**



Juan Manuel Capece  
 Presidente



Andrés E. Clocchini  
 Director Técnico  
 Matrícula Número 7227

Kit components / Presentations

Components	Description	15-CL03-2P Presentation 2 microplates	15-CL03-4P Presentation 4 microplates
Microplate	96-well microtitre plate (12 x 8 strip wells with strip holder) coated with the antigen, sealed and stored dry	2 microplates (192 tests)	4 microplates (384 tests)
Conjugate	Lyophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG antibodies)	2 units	4 units
Substrate-chromogen solution	Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing hydrogen peroxide (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 (sufficient for 1.2 liters)	2 x 60 ml, 10X (sufficient for 1.2 liters)
Sample diluent	Ready to use - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0.01%].	2 x 120 ml	3 x 120 ml
Positive control	Inactivated 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 0.1 ml
Negative control	Inactivated 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 0.1 ml
Polyethylene bag	With hermetic closure. Reusable.	1 unit	1 unit
Instruction manual		1 unit	1 unit

## Name and application

### CHEMLIS® Brucella canis iELISA

Indirect ELISA kit for the detection of antibodies against *Brucella canis* in human serum and plasma.

CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA is an indirect ELISA kit (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) for the detection of IgG specific antibodies against *Brucella canis* in serum samples or plasma obtained with heparin, sodium citrate and EDTA. Thanks to its exclusive Pure-R technology, the kit has an excellent diagnostic performance. CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA can be used as a screening and/or a confirmatory test.

## Introduction

Brucellosis is a highly contagious zoonosis disease caused by Gram-negative bacteria of the genus *Brucella*. Conventionally, *Brucella* species are classified according to the presence or absence of the O antigen in the surface lipopolysaccharide (LPS). The smooth species (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) express the complete form of LPS (smooth lipopolysaccharide, sLPS); instead, rough species (*B. canis* and *B. ovis*) do not express the O antigen in the outer membrane presenting an incomplete form of LPS (rough lipopolysaccharide, rLPS). *Brucella canis*, the etiological agent of brucellosis in dogs, is the only *Brucella* species with rLPS capable of infecting humans and cause the disease.

The confirmatory diagnosis of brucellosis is performed directly by isolating the organism from blood or other tissues. However, due to the slow growth of *Brucella canis* in primary cultures (up to 7 days), the risk involved in manipulating the bacteria and the low sensitivity of its isolation, determined that the isolation of *B. canis* for diagnosis is not always feasible and effective. For this reason,

the laboratory diagnosis of brucellosis is mainly based on the detection of specific antibodies against *B. canis* rLPS in serum samples.

## Principles of the technique

CHEMLIS® *Brucella canis* iELISA kit is a solid phase enzyme immunoassay for the detection of IgG specific antibodies against the rough lipopolysaccharide (rLPS) of *Brucella canis* in human serum and plasma. In this assay the antibodies present in the sample react with the LPSr (purified by the exclusive technology Pure-R) that coat the wells. If the sample contains antibodies against *B. canis* LPSr, they bind to the well. Upon addition of the horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody, a complex is formed with the IgG antibodies attached to the antigen. 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 and color intensity is directly proportional to the amount of antibodies present in the sample reacting with the antigens. The higher the antibody titer present in the sample, the more intense color develops in the test wells. Adding the stop solution, upon which a color change to yellow is observed, stops the reaction. The results are measured in a microplate spectrophotometer determining the absorbance (Abs) at 450 nm.

## Storage and expiration

Storage: 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.

Shelf life: 12 months. Do not use reagents from different lots or after the expiration date.

## Materials needed but not provided



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Ciochini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227



- 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 water (Type II) or ultrapure water (Type I).
- Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive).

### Precautions

1. Carefully read and strictly follow all instructions detailed in the leaflet 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. The 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 water (Type II) or ultrapure water (Type I).

### Preparation of reagents

#### a. Wash solution 1X

The 10X concentrated Wash solution should be brought to room temperature (20-25°C) and mixed to ensure dissolution of any precipitated salts.

The 10X concentrated Wash solution must be diluted 1/10 with distilled (Type II) or ultrapure (Type I) water; for example, adding 30 ml of 10X Wash solution to 270 ml of water (sufficient quantity of Wash solution 1X to process one microplate: 10 ml to reconstitute the IgG conjugate and the rest for the washes). Mix very well before using. Once prepared, the 1X Wash solution can be stored at 2-8 °C for up to 7 days.

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 Wash solution carefully. Allow to stand for a minute and mix well. Prepare immediately 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 remaining conjugate can be aliquoted in eppendorf type tubes and stored at



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

-20°C (cannot be stored in the refrigerator) for up to 3 months. During this period of time each aliquot can be thaw and re-frozen one time.

### Preparation of controls

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

Controls (PC and NC) should be diluted 1:400 using the Sample diluent.

Add 2 µl of the corresponding control to 800 µl of Sample diluent (dilution 1:400) and mix well. Use 100 µl of each diluted control per well and in duplicate.

#### 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

Samples should be diluted 1:400 using the Sample diluent.

Add 2 µl of serum/plasma to 800 µl of Sample diluent (dilution 1:400) and mix well. Use 100 µl of the diluted sample per well.

#### Notes:

-It is recommended to analyze serum or plasma (obtained using heparin, sodium citrate or EDTA as anticoagulant) samples recently obtained (fresh) and free of turbidity.

-If the samples contain particles or a high content of triglycerides, they should be clarified by centrifugation.

-If the samples are not analyzed immediately, they can be kept refrigerated (2 to 8 °C) for up to 72 hs. For longer storage, store at -20°C (-15 to -20°C), taking into account that during storage and as a consequence of the freezing and thawing process, the antibody titer may change. If samples are frozen, they must be completely thawed, homogenized and centrifuged before testing.

-It is recommended to analyze the samples at least in duplicate.

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

### Test procedure

1. Allow the reagents equilibrate to room temperature (20-25°C). Do not remove the plate from its pouch until it has reached room temperature. If the entire plate is not used, separate only the 8-well strips needed to analyze the controls and samples. Store the rest of the strips, 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 stored in the hermetically sealed polyethylene bag with the desiccants, and in the refrigerator (2-8°C) for up to 4 months, as long as the indicated expiration date is not exceeded.

2. Add in duplicate 100 µl per well of the positive control, negative control and sample blank. See Item Preparation of controls.

3. Add 100 µl per well of each sample. See Item Sample preparation.

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

5. Wash/rinse the plates 5 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.

Juan Manuel Capece  
Presidente

Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

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 ( $PR_{PC} = 100\%$ ) with respect to the positive control (PC) included in each test. The absorbance values measured at 450 nm ( $Abs_{450}$ ) of each sample are related to the  $Abs_{450}$  value of the PC as follows:

$$PR_{SAMPLE} = \frac{Abs_{450} \text{ Sample}^*}{Average Abs_{450} PC} \times 100$$

\* If the sample was run in duplicate, consider the average of the  $Abs_{450}$  value.

**Validity criteria**

To confirm the validity of the test the following criteria must be met:

- The average value of the PC ( $Abs_{450}$ ) must be higher than 1.2 ( $Abs_{450} PC > 1.2$ ).
  - The  $Abs_{450}$  values of the controls (PC and NC) and samples duplicates must not differ by more than 20% of the corresponding average.
  - The  $Abs_{450}$  values of the blank sample must be less than 0.1 ( $Abs_{450} \text{ Blank sample} < 0.1$ ).
  - The average  $Abs_{450}$  value of the NC must be less than 0,15 (Average  $Abs_{450} NC < 0.15$ ).
  - The Average  $Abs_{450} PC / Average Abs_{450} NC$  ratio must be higher than 8 (Average  $Abs_{450} PC / Average Abs_{450} NC > 8$ ).
- If any of these criteria is not fulfilled, the test is considered invalid. In this case, the test should be repeated strictly fol-

lowing the instructions detailed in the Instruction manual included in the kit.

**Interpretation of results**

The test sample results should be interpreted as follows:

Sample (dilution 1:400)

PR	Interpretation
≤ 45%	Non-Reactive
> 45 ≤ 60%	Indeterminate
> 60%	Reactive

In the case of obtaining an "Indeterminate" result, the sample should be re-tested. If the result is still indeterminate, it is recommended to test a second sample obtained after a period of at least three weeks. If the new sample is indeterminate again, the epidemiological situation should be considered and the sample should be analyzed with another technique if available.

**Performance characteristics**

*Diagnostic sensitivity and specificity*

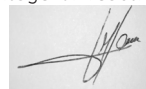
More than 600 serum samples obtained from patients with Brucellosis by *B. canis* and from healthy donors were analyzed to determine the diagnostic sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the assay. Based on these results, a ROC (receiver-operating-analysis) curve analysis was performed. This analysis allowed us to select the cut-off value that concurrently optimized the Se and Sp of the assay (45%) and the cut-off value for which a 100 % Se was achieved (60%).

**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>
45	100 (93.6 - 100)	99.6 (98.7 - 99.9)	0.996
60	87.5 (75.9- 94.8)	100 (99.3 - 100)	0.875

(a) PR, percentage of reactivity. (b) Se, sen-



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

sitivity (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).

#### *Hook effect*

Based on the analysis of samples with high titers of specific anti-Brucella antibodies, it was determined that the CHEMLIS® Brucella canis iELISA kit does not have a hook effect in the detection of IgG antibodies.

#### *Cross reactivity*

Cross-reactivity of CHEMLIS® Brucella canis iELISA was evaluated by testing clinical samples obtained from patients with other conditions. Samples with positive serology obtained from patients with the following diseases or bacterial, parasitic, and viral infections were analyzed:

-Bacterial: Escherichia coli O157, O145 and O121 infections, Tuberculosis, Syphilis, Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii infections.

-Viral: Dengue, VHB, VHC, HTLV I/II, HIV, Hantavirus.

-Parasitic: Chagas, Leishmaniasis y Toxoplasmosis.

-Autoimmune diseases: rheumatoid arthritis, Systemic Lupus Erythematosus and autoimmune vasculitis.

CHEMLIS® Brucella canis iELISA has a high level of specificity as no cross-reactivity was observed with the exception of 1 sample out of 9 obtained from patients with autoimmune diseases, 1 out of 5 from patients with syphilis and 1 out of 9 from patients with Toxoplasmosis. However, it is important to note that, in previous seroprevalence studies carried out in our laboratory with more than 800 samples obtained from blood banks, we have observed a population seroprevalence of anti-B. canis of 5%. Therefore, in these three cases where we observed cross-reactivity, we cannot rule out a current or previous infection by B. canis,

which would explain the positive result obtained with the CHEMLIS® Brucella canis iELISA kit.

#### *Interfering substances*

The following potentially interfering substances have no impact on the performance of CHEMLIS® Brucella canis iELISA (final test concentrations of interfering substances are indicated in parentheses):

-Oxalic acid (0.6 mg/ml)

-Bovine albumin (20 mg/ml)

-Human Immunoglobulin G (hIgG) (2 mg/ml)

-Human Immunoglobulin M (hIgG) (2 mg/ml)

-Human Immunoglobulin A (hIgG) (2 mg/ml)

-Cholesterol (5 mg/ml)

-Hemoglobin (10 mg/ml)

-Bilirubin (2 mg/ml)

#### *Repeatability and Reproducibility*

Repeatability and reproducibility of CHEMLIS® Brucella canis iELISA was established using in-house reference panels containing negative specimens and a range of positive specimens. There were no differences observed within-run, between-run, between-lots, between-sites, and between-days.

#### **For technical assistance**

Tel: (54-11) 5353-6066

info@chemtest.net

chemtest.net

#### **References**

-Serantes, D. R., Cortina, E., Novak, A., Wallach, J., Ugalde, J. E., Ciocchini, A. E., and Comerci, D. (2018). Development of high-performance immunoassay for Brucella canis and seroprevalence survey in humans and dogs of Buenos Aires urban area.

International Journal of Infectious Diseases, 73, 387. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.4290>.













Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Ciocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

## Indice de símbolos / Symbol index

	Fecha de vencimiento / Expiration date
	Número de catálogo / Catalog number
	Lote / Batch code
	Para diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use only
	Límites de temperatura / Temperature limits
	Consultar instrucciones para su uso / See instructions for use
	Número de determinaciones / Number of determinations
	Fabricante / Manufacturer
	Riesgo biológico / Biological risk

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



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

Juan Manuel Capece  
Presidente


Andrés E. Ciocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227



ELISA



Humanos

 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)



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
Las Malvinas son argentinas

**Hoja Adicional de Firmas**  
**Informe gráfico**

**Número:**

**Referencia:** RÓTULOS Y MANUAL DE INSTRUCCIONES 1 EX-2021-85838687- -APN-DGA#ANMAT

---

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 23 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica  
Date: 2022.10.25 10:00:34 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental  
Electronica  
Date: 2022.10.25 10:00:34 -03:00

## CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA

### Rótulos externos e internos

#### -Presentación 2 microplacas (REF: 15-CL02-2P)

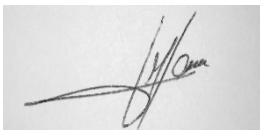
##### Rótulos externos

**A) Principal (arriba) (166 mm x 95 mm):** etiqueta principal con la denominación, números de referencia y lote, número de determinaciones, fecha de vencimiento y temperatura de conservación.












The main label features the CHEMTEST logo in the top right corner. The product name 'CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA' is prominently displayed. Below it, the text describes the kit's purpose: 'Kit para la detección de anticuerpos anti Brucella abortus, B melitensis y B. suis en muestras de suero y plasma de humanos' and its English equivalent. Regulatory information includes 'Autorizado por ANMAT PM 2360-03' and 'Validado por ANLIS MALBRÁN UNSAM'. A blue bar at the bottom contains icons for 'ELISA' (four circles) and 'Humanos' (person icon), along with technical details: REF 15-CL02-2P, LOT 15-CL02/2003-1, 192 determinations, expiration date 03/2021, and storage temperature 2°C to 8°C. Contact information for Chemtest Argentina S.A. is provided at the bottom.

**B) Etiqueta lateral (140 mm x 80 mm):** tabla con los logos que se usan y su significado en español e inglés.

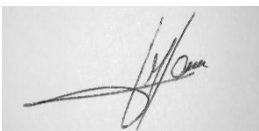




CHEMLIS®	
Símbolo / Symbol	
	Fecha de vencimiento / Expiration date
	Número de catálogo / Catalog number
	Lote / Batch code
	Para diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use only
	Límites de temperatura / Temperature limits
	Consultar instrucciones para su uso / See instructions for use
	Número de determinaciones / Number of determinations
	Fabricante / Manufacturer
	Riesgo biológico / Biological risks

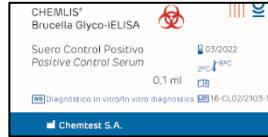
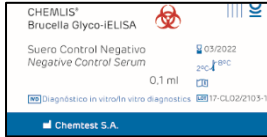
**C) Etiqueta lateral (140 mm x 80 mm):** tabla con los componentes del kit según presentación en español e inglés.

esp			eng		
CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA			CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA		
Componentes / Presentaciones			Kit components / Presentations		
Componentes	REF: 15-CL02-2P	REF: 15-CL02-4P	Components	REF: 15-CL02-2P	REF: 15-CL02-4P
Microplaca de análisis	2 microplacas (192 deter.)	4 microplacas (384 deter.)	Microplates	2 microplates (192 tests)	4 microplates (384 tests)
Conjugado	2 unidades	4 unidades	Conjugate	2 units	4 units
Solución sustrato-cromógeno	1 x 30 ml	1 x 60 ml	Substrate-chromogen solution	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de frenado	1 x 30 ml	1 x 60 ml	Stop solution	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de lavado	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	Wash solution	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 liters)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 liters)
Diluyente de muestra	2 x 120 ml	3 x 120 ml	Sample diluent	2 x 120 ml	3 x 120 ml
Control positivo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml	Positive control	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Control negativo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml	Negative control	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Bolsa de polietileno	1 unidad	1 unidad	Polyethylene bag	1 unit	1 unit
Manual de instrucciones	1 unidad	1 unidad	Instruction manual	1 unit	1 unit

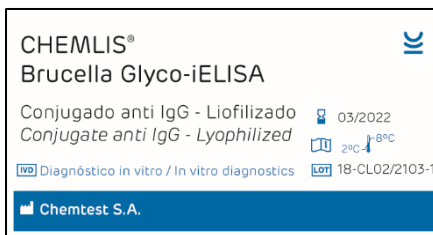



### Rótulos internos

#### A) CONTROLES (35 mm x 20 mm):



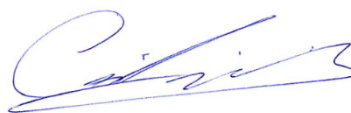
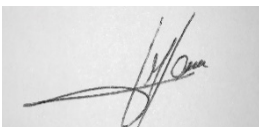
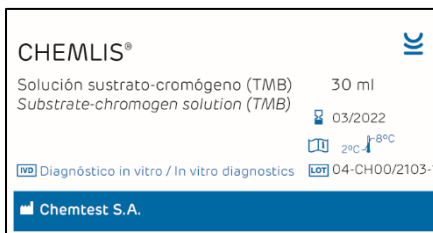
#### B) CONJUGADO (58 mm x 30 mm): x2



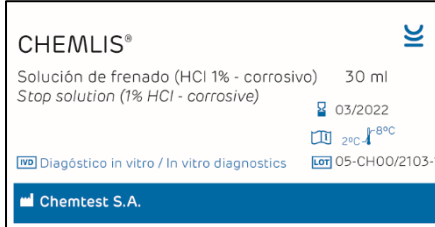
#### C) SOLUCION DE LAVADO (58 mm x 30 mm):



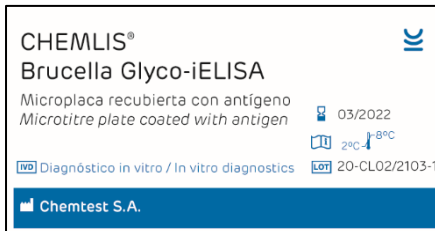
#### D) SOLUCION SUSTRATO-CROMOGENO (58 mm x 30 mm):



**E) SOLUCION DE FRENADO (58 mm x 30 mm):**



**F) MICROPLACA (58 mm x 30 mm): x2**



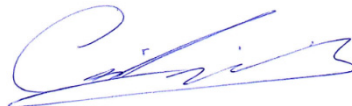
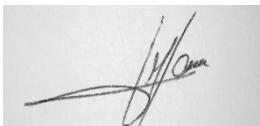
**G) DILUYENTE DE MUESTRA (58 mm x 30 mm): x2**



**-Presentación 4 microplacas (REF: 15-CL02-4P)**

**Rótulos externos**

**A) Principal (arriba) (166 mm x 95 mm): etiqueta principal con la denominación, números de referencia y lote, número de determinaciones, fecha de vencimiento y temperatura de conservación.**





## CHEMLIS®

# Brucella Glyco-iELISA


Kit para la detección de anticuerpos anti Brucella abortus, B melitensis y B. suis en muestras de suero y plasma de humanos

*Kit for the detection of antibodies against Brucella abortus, B melitensis and B. suis in human serum and plasma*

Autorizado por ANMAT PM 2360-03

Validado por  ANLIS MALBRÁN

**IVD** Diagnóstico in vitro / In vitro diagnostics  UNSAM



ELISA



Humanos


**REF** 15-CLO2-4P ▽ 384

**LOT** 15-CLO2/2003-1 📅 03/2021

📖 2°C / 8°C







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

**B) Etiqueta lateral (140 mm x 80 mm):** tabla con los logos que se usan y su significado en español e inglés.

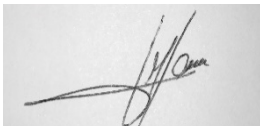
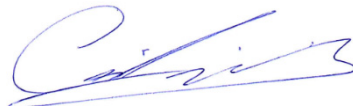


## CHEMLIS®

Símbolo / Symbol

	Fecha de vencimiento / Expiration date
<b>REF</b>	Número de catálogo / Catalog number
<b>LOT</b>	Lote / Batch code
<b>IVD</b>	Para diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use only
	Límites de temperatura / Temperature limits
	Consultar instrucciones para su uso / See instructions for use
	Número de determinaciones / Number of determinations
	Fabricante / Manufacturer
	Riesgo biológico / Biological risks

**C) Etiqueta lateral (140 mm x 80 mm):** tabla con los componentes del kit según presentación en español e inglés.

esp CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA Componentes / Presentaciones			eng CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA Kit components / Presentations		
Componentes	REF: 15-CL02-2P	REF: 15-CL02-4P	Components	REF: 15-CL02-2P	REF: 15-CL02-4P
Microplaca de análisis	2 microplacas (192 deter.)	4 microplacas (384 deter.)	Microplates	2 microplates (192 tests)	4 microplates (384 tests)
Conjugado	2 unidades	4 unidades	Conjugate	2 units	4 units
Solución sustrato-cromógeno	1 x 30 ml	1 x 60 ml	Substrate-chromogen solution	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de frenado	1 x 30 ml	1 x 60 ml	Stop solution	1 x 30 ml	1 x 60 ml
Solución de lavado	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)	Wash solution	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 liters)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 liters)
Diluyente de muestra	2 x 120 ml	3 x 120 ml	Sample diluent	2 x 120 ml	3 x 120 ml
Control positivo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml	Positive control	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Control negativo	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml	Negative control	1 x 0,1 ml	1 x 0,1 ml
Bolsa de polietileno	1 unidad	1 unidad	Polyethylene bag	1 unit	1 unit
Manual de instrucciones	1 unidad	1 unidad	Instruction manual	1 unit	1 unit

## Rótulos internos

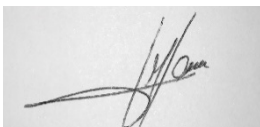
### A) CONTROLES (35 mm x 20 mm):



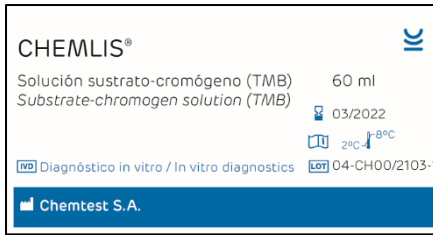
### B) CONJUGADO (58 mm x 30 mm): x4



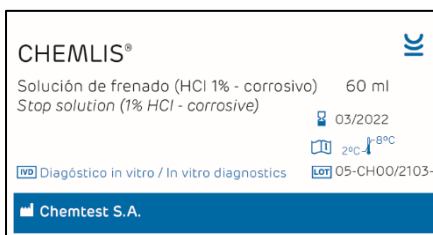
### C) SOLUCION DE LAVADO (58 mm x 30 mm): x2

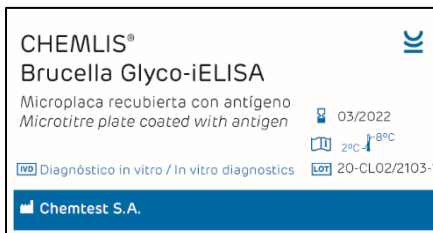

**D) SOLUCION SUSTRATO-CROMOGENO (58 mm x 30 mm):**



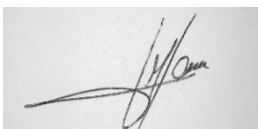
**E) SOLUCION DE FRENADO (58 mm x 30 mm):**



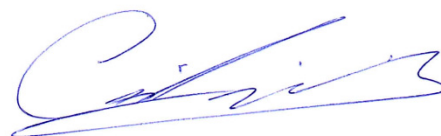
**F) MICROPLACA (58 mm x 30 mm): x4**



**G) DILUYENTE DE MUESTRA (58 mm x 30 mm): x3**



Juan Manual Capece  
Presidente



Andrés E. Ciochini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

# CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA



Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti Brucella abortus, Brucella melitensis y Brucella suis en muestras de suero y plasma de humanos.

*Indirect ELISA kit for the detection of anti Brucella abortus, Brucella melitensis and Brucella suis antibodies in human serum and plasma.*

Juan Manuel Capece  
Presidente

Andrés E. Ciocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

Autorizado por ANMAT PM 2360-03



ELISA



Humanos



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

**CHEMLIS®**  
**Brucella Glyco-iELISA**

Componentes / Presentaciones

Componentes	Descripción	15-CLO2-2P Preentación 2 placas	15-CLO2-4P Preentación 4 placas
Microplaca de análisis	Microplacas de 96 pocillos (12 strips x 8 pocillos con marco) recubiertas con el antígeno, selladas y almacenadas en seco	2 microplacas (192 determinaciones)	4 microplacas (384 determinaciones)
Conjugado	Liofilizado (anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano)	2 unidades	4 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)	2 x 60 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)
Diluyente de muestra	Para reconstituir - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0,01%]	2 x 120 ml	3 x 120 ml
Control positivo	Suero inactivado - 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 0,1 ml
Control negativo	Suero inactivado - 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 0,1 ml
Bolsa de polietileno	Con cierre hermético. Reutilizable.	1 unidad	1 unidad
Manual de instrucciones		1 unidad	1 unidad






## Nombre y aplicación

CHEMLIS®

Brucella Glyco-iELISA

Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti Brucella abortus, Brucella melitensis y Brucella suis en muestras de suero y plasma de humanos.

El kit CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA es el primer ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto y recombinante para la detección de anticuerpos IgG específicos contra el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de Brucella abortus, Brucella melitensis y Brucella suis en muestras de suero o plasma obtenido con heparina, citrato de sodio o EDTA. Gracias a la incorporación de la exclusiva tecnología GlycoEng, el kit posee un excelente desempeño diagnóstico y minimiza las reacciones cruzadas con otras bacterias Gram-negativas. CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA puede usarse como test de screening (tamizaje) y/o confirmatorio.

## Introducción

La brucelosis humana es una de las zoonosis bacterianas más extendidas del mundo y en la última década han surgido nuevos focos de la enfermedad. Cada año, se reportan más de 500.000 casos nuevos a nivel mundial con tasas de incidencia anuales que varían ampliamente (de < 2 a > 500 por cada 1.000.000 de habitantes) entre diferentes regiones. Los agentes etiológicos de la brucelosis son bacterias Gram negativas del género Brucella. B. melitensis, B. abortus y B. suis son las tres principales especies de Brucella que causan la enfermedad en humanos y sus hospedadores naturales son ovejas y cabras, vacas y cerdos, respectivamente. La infección se transmite principalmente por el consumo de productos lácteos no pasteurizados, el contacto directo con animales infectados (trabajadores de mataderos y veterinarios) y el

manejo de cultivos y muestras clínicas en laboratorios clínicos, de investigación y producción.

El amplio espectro de manifestaciones clínicas y la falta de síntomas patognomónicos hacen que la brucelosis humana sea difícil de diagnosticar y distinguir clínicamente de varias afecciones febriles que a menudo ocurren en las mismas áreas; por lo tanto, las pruebas de laboratorio son esenciales para diagnosticar la enfermedad. A pesar de que el aislamiento de Brucella, principalmente a partir de muestras de sangre, sigue siendo el método gold estándar para el diagnóstico de brucelosis, este presenta varios inconvenientes. El crecimiento lento de Brucella a partir de cultivos primarios retrasa el diagnóstico durante varios días y la sensibilidad es a menudo muy baja entre 50 y 90% dependiendo de la etapa de la enfermedad, el uso previo de antibióticos, la muestra clínica y el método de cultivo empleado. Además, no todos los laboratorios cuentan con instalaciones adecuadas para su cultivo. Por lo tanto, cuando la enfermedad no puede ser confirmada mediante el aislamiento de la bacteria, las pruebas serológicas desempeñan un papel importante en el diagnóstico de rutina de la brucelosis.

Actualmente, las pruebas serológicas más comúnmente utilizadas en humanos son la aglutinación, fijación del complemento y los inmunoensayos enzimáticos. Todos estos ensayos utilizan como antígeno la bacteria entera inactivada o extractos bacterianos que contienen altas concentraciones del lipopolisacárido liso (sLPS), ya que el polisacárido O del sLPS es el antígeno inmunodominante en las infecciones por brucelas lisas.

## Principio de la técnica

El kit CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA es el primer enzimoimmunoensayo indirecto en fase sólida basado exclusivamente en la detección de anticuerpos IgG específicos dirigidos contra el polisacárido O de Brucella abortus, Brucella melitensis



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

y *Brucella suis*. Un resultado positivo en el kit CHEMLIS® *Brucella Glyco-iELISA* 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 oligosacárido del LPS de otras bacterias.

En este ensayo los anticuerpos presentes en la muestra reaccionan con el antígeno (glicoproteína recombinante purificada) que recubre los pocillos. Si la muestra contiene anticuerpos contra el polisacárido O de *B. abortus*, *B. melitensis* y/o *B. suis*, estos se unen al pocillo. Al añadir los anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), se forma un complejo con los anticuerpos IgG unidos al antígeno. 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 y la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra que reaccionan con los antígenos. 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 (probeta) para preparación de solución de lavado.
- Agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I).
- 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, 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 representan ningún riesgo potencial para la salud y el medio ambiente.



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

6. No usar el kit pasada la fecha de caducidad o si los componentes no fueron conservados en las condiciones indicadas arriba.
7. No mezclar componentes o manuales de instrucciones de kits de distintos lotes.
8. Manipule los componentes del kit con cuidado para evitar la contaminación de los mismos.
9. Si se reutilizan los contenedores para pipeta multicanal, los mismos deben ser lavados de forma exhaustiva con agua de alta calidad e identificados para ser reutilizados con la misma solución.
10. Usar puntas de pipetas distintas para cada reactivo y para cada muestra.
11. Incluir los controles positivo y negativo, y el blanco de muestra al menos por duplicado en cada serie de análisis.
12. Para la reconstitución de los reactivos usar solamente agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I).

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

#### a. Solución de lavado 1X

Llevar la Solución de lavado concentrada 10X a temperatura ambiente (20- 25°C) y agitar muy bien para garantizar la completa disolución de posibles precipitados.

La Solución de lavado concentrada 10X debe diluirse 1/10 con agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I); por ejemplo, agregando 30 ml de Solución de lavado 10X a 270 ml de agua (cantidad suficiente de Solución de lavado 1X para procesar una microplaca: 10 ml para reconstituir el conjugado IgG, 120 ml para reconstituir el Diluyente de muestra y el resto para 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.

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. Preparar inmediatamente 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).

La solución de conjugado sobrante se puede alicuotar en tubos tipo eppendorf y conservar a -20°C (no se puede conservar en el refrigerador) durante un tiempo máximo de 3 meses. En este período de tiempo cada alícuota se puede congelar y descongelar una sola 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 (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)

Los controles (CP y CN) deben diluirse 1:400 utilizando el Diluyente de muestra.

Agregar 2 µl del control correspondiente a 800 µl de Diluyente de muestra (dilución 1:400) y mezclar bien. Usar 100 µl de cada control diluido por pocillo y por duplicado.

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



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

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 deben diluirse 1:400 utilizando el Diluyente de muestra.

Agregar 2 µl de suero o plasma a 800 µl de Diluyente de muestra (dilución 1:400) y mezclar bien. Usar 100 µl de la muestra diluida por pocillo.

#### Notas:

-Se recomienda analizar muestras de suero o plasma (obtenidas con heparina, citrato de sodio o EDTA como anticoagulante) recientemente obtenidas (frescas) y libres de turbidez.

-Si las muestras contienen partículas o un alto contenido de triglicéridos deberán clarificarse mediante centrifugación.

-Si las muestras no se analizan en forma inmediata estas se pueden conservar refrigeradas en la heladera (2 a 8 °C) hasta 72 hs. Para una conservación más prolongada conservar a -20°C (-15 a -20°C) teniendo en cuenta que durante la conservación y como consecuencia del proceso de congelado y descongelado el título de anticuerpos puede cambiar y producir resultados erróneos. Si las muestras se congelan, estas se deben descongelar totalmente, homogeneizar y centrifugar antes de realizar el análisis.

-Se recomienda analizar las muestras al menos por duplicado.

-Las muestras contaminadas y/o en mal estado pueden producir resultados erróneos.

### Procedimiento de la prueba

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 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

con los desecantes, y en el refrigerador (2-8°C) hasta 4 meses mientras no supere la fecha de vencimiento indicada en la caja.

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. Ver ítem-Preparación de las muestras.

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

5. Lavar 4 veces con 200 µl de Solución de lavado 1X por pocillo. Ver ítem Preparación de reactivos.

Nota: retirar el líquido completamente después de cada lavado por volcado y golpeando la placa sobre material absorbente o aspiración con pipeta. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de agregar el reactivo siguiente.

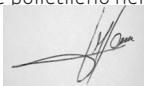
6. Agregar 100 µl del Conjugado a cada pocillo. Ver ítem-Preparación del conjugado. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

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 ( $\pm 1$  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.



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Ciocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

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 incluido en cada ensayo ( $PR_{CP} = 100\%$ ). Los valores de absorbancia medidos a 450 nm ( $Abs_{450}$ ) de cada muestra se relacionan con el valor de  $Abs_{450}$  del control positivo (CP) de la siguiente forma:

$$PR_{Muestra} = \frac{Abs_{450} \text{ Muestra}^*}{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CP}} \times 100$$

\*  $Abs_{450}$  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  $Abs_{450}$  del CP debe ser mayor a 1,6 (Promedio  $Abs_{450}$  CP > 1,6).
- Los valores de  $Abs_{450}$  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  $Abs_{450}$  del Blanco de muestra (Blc Mtra) deben ser inferiores a 0,1 ( $Abs_{450}$  Blc Mtra < 0,1).
- El valor promedio de la  $Abs_{450}$  del CN debe ser menor a 0,15 (Promedio  $Abs_{450}$  CN < 0,15).
- La relación Promedio  $Abs_{450}$  CP / Promedio  $Abs_{450}$  CN debe ser mayor a 10 (Promedio  $Abs_{450}$  CP / Promedio  $Abs_{450}$  CN > 10).

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:

Muestra (dilución 1:400)

PR	Interpretación
≤ 34%	No Reactivo
> 34 ≤ 52%	Indeterminado
> 52%	Reactivo

En caso de obtener un resultado "Indeterminado" la prueba se debe repetir con la misma muestra. Si el resultado es todavía indeterminado, se recomienda ensayar una segunda muestra 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.

### Evaluación de desempeño

#### Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Para determinar la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) diagnóstica del ensayo, se analizaron más de 390 muestras de suero obtenidas de pacientes con diagnóstico de brucelosis causada por *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis* y de individuos sanos. A partir de los resultados obtenidos con estas muestras se realizó un análisis por curvas ROC (receiver-operating-analysis). 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%. El valor de corte que maximiza simultáneamente la Se y Sp (máximo valor del índice de Youden, J) coincide con el valor de corte para el cual la Se es máxima (Se = 100%).



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

**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>
34	100 (95,3 - 100)	99,4 (97,7 - 99,9)	<b>0,994</b>
52	91,0 (82,2 - 96,3)	100 (98,8 - 100)	0,909

(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).

### Efecto hook

A partir del análisis de muestras con altos títulos de anticuerpos específicos anti Brucella se determinó que el kit CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA no presenta efecto hook en la detección de anticuerpos IgG.

### Reactividad cruzada

La reactividad cruzada de CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA se evaluó analizando muestras con serología positiva obtenidas de pacientes con las siguientes enfermedades o infecciones bacterianas, parasitarias y virales:

-Bacterianas: infección por Escherichia coli O157, O145 y O121, Tuberculosis, Sífilis, infección por Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae y Acinetobacter baumannii.

-Virales: Dengue, VHB, VHC, HTLV I/II, HIV, Hantavirus.

-Parasitarias: Chagas, Leishmaniasis y Toxoplasmosis.

-Enfermedades autoinmunes: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y vasculitis autoinmune.

CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA presenta un alto nivel de especificidad ya que no se observó reactividad cruzada con

ninguna de las muestras obtenidas de pacientes con otras afecciones o infecciones bacterianas, virales o parasitarias.

### Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias potencialmente interferentes no tienen ningún impacto en el desempeño de CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA (las concentraciones de prueba finales de las sustancias interferentes se indican entre paréntesis):

-Ácido oxálico (0,6 mg/ml)

-Albumina bovina (20 mg/ml)

-Inmunoglobulina G Humana (hIgG) (2 mg/ml)

-Inmunoglobulina M Humana (hIgG) (2 mg/ml)

-Inmunoglobulina A Humana (hIgG) (2 mg/ml)

-Colesterol (5 mg/ml)

-Hemoglobina (10 mg/ml)

-Bilirrubina (2 mg/ml)

### Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad y reproducibilidad de CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA se estableció utilizando paneles de referencia internos que contienen muestras negativas y una variedad de muestras positivas. No se observaron diferencias dentro de las evaluaciones, entre evaluaciones, entre lotes, entre sitios y entre días.

### Advertencias

-Para uso exclusivo profesional.

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

### ANMAT

-Autorizado por ANMAT PM 2360-03.

Chemtest Argentina S.A. Legajo N° 2360.

-Director Técnico: Andrés E. Ciochini.

### Para asistencia técnica

Ante cualquier consulta por favor contactar al tel (+54 11) 5353 6066 o a través de info@chemtest.net / chemtest.net



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Ciochini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Ciochini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

## CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA

### Kit components / Presentations

Components	Description	15-CL02-2P Presentation 2 microplates	15-CL02-4P Presentation 4 microplates
Microplate	96-well microtitre plate (12 x 8 strip wells with strip holder) coated with the antigen, sealed and stored dry	2 microplates (192 tests)	4 microplates (384 tests)
Conjugate	Lyophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG antibodies)	2 units	4 units
Substrate-chromogen solution	Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing hydrogen peroxide (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 (sufficient for 1.2 liters)	2 x 60 ml, 10X (sufficient for 1.2 liters)
Sample diluent	To reconstitute - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0.01%].	2 x 120 ml	3 x 120 ml
Positive control	Inactivated 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 0.1 ml
Negative control	Inactivated 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 0.1 ml
Polyethylene bag	With hermetic closure. Reusable.	1 unit	1 unit
Instruction manual		1 unit	1 unit

## Name and application

### CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA

Indirect ELISA kit for the detection of antibodies against *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* in human serum and plasma.

CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA is the first indirect and recombinant ELISA kit (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) for the detection of IgG specific antibodies against the O polysaccharide of the lipopolysaccharide (LPS) of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* in serum samples or plasma obtained with heparin, sodium citrate or EDTA. Thanks to its exclusive GlycoEng technology, the kit has an excellent diagnostic performance and minimizes cross-reaction with other Gram-negative bacteria. CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA can be used as a screening and/or a confirmatory test.

### Introduction

Human brucellosis is one of the world's most widespread bacterial zoonoses and, over the past decade, new foci of the disease have emerged. Every year, more than 500,000 new cases are reported globally with annual incidence rates that varies widely (from < 2 to > 500 per 1,000,000 population) among different regions. The etiological agents of brucellosis are Gram-negative bacteria of the genus *Brucella*. *B. melitensis*, *B. abortus* and *B. suis* are the three main human brucellosis pathogens whose preferred natural host animals are sheep and goats, cattle, and swine, respectively. The infection is primarily transmitted by consumption of unpasteurized dairy products, direct contact with infected animals (slaughterhouse workers and veterinarians), and handling of cultures and clinical specimens in clinical, research, and production laboratories.

Brucellosis can lead to serious complications in affected patients with an important public health issue.

The wide spectrum of clinical manifestations and lack of pathognomonic symptoms make human brucellosis difficult to clinically diagnose and distinguish from several febrile conditions that often occur in the same areas; therefore, laboratory tests are essential for diagnosing the disease. Even though isolation of *Brucella*, mainly from blood, continues to be the gold standard method for the diagnosis of brucellosis, it presents several drawbacks. The slow growth of *Brucella* in primo-cultures delays diagnosis for several days and the sensitivity is often low ranging from 50 to 90% depending on the stage of the disease, previous use of antibiotics, the clinical specimen, and the culture method employed. Furthermore, culturing *Brucella* sp. is hazardous and not all the laboratories have suitable culture facilities. Hence, when the disease cannot be confirmed by culture, serological tests play a major role in the routine diagnosis of brucellosis.

Currently, the diagnostic methods most commonly used for human serological testing are agglutination, complement fixation, and enzyme immunoassay test. All these assays use as antigen the whole bacteria or bacterial extracts containing high concentrations of the smooth lipopolysaccharide (sLPS) since the humoral immune response to smooth brucellae is dominated by antibodies to the O-polysaccharide section of *Brucella* sLPS.

### Principles of the technique

CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA kit is the first indirect solid phase enzyme immunoassay based exclusively on the detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* anti-O polysaccharide IgG antibodies. A positive result by CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA indicates the presence of anti-O polysaccharide antibodies. These antibodies are an excellent specific mark-



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227



er of Brucella infection, which allows to confirm the diagnosis of infection eliminating the risk of false-positive cross-reactions due to the presence of antibodies directed against common epitopes present in the lipid A and the core of the LPS from other bacteria.

In this assay the antibodies present in the sample react with the antigen (purified recombinant glycoprotein) that coats the wells. If the sample contains antibodies against the O polysaccharide of Brucella abortus, Brucella melitensis and/or Brucella suis, they bind to the well. Upon addition of the horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody, a complex is formed with the IgG antibodies attached to the antigen. 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 and color intensity is directly proportional to the amount of antibodies present in the sample reacting with the antigens. The higher the antibody titer present in the sample, the more intense color develops in the test wells. Adding the stop solution, upon which a color change to yellow is observed, stops the reaction. The results are measured in a microplate spectrophotometer determining the absorbance (Abs) at 450 nm.

### Storage and expiration

Storage: 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.

Shelf life: 12 months. Do not use reagents from different lots or after the expiration date.

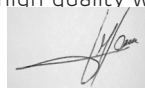
### Materials needed but not provided

-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.
- Container (graduated cylinder) for the preparation of the wash solution.
- Distilled water (Type II) or ultrapure water (Type I).
- Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive).

### Precautions

1. Carefully read and strictly follow all instructions detailed in the leaflet 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. The 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



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

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 water (Type II) or ultrapure water (Type I).

## Preparation of reagents

### a. Wash solution 1X

The 10X concentrated Wash solution should be brought to room temperature (20-25°C) and mixed to ensure dissolution of any precipitated salts.

The 10X concentrated Wash solution must be diluted 1/10 with distilled (Type II) or ultrapure (Type I) water; for example, adding 30 ml of 10X Wash solution to 270 ml of water (sufficient quantity of Wash solution 1X to process one microplate: 10 ml to reconstitute the IgG conjugate, 120 ml to reconstitute the Sample diluent and the rest for the washes). Mix very well before using. Once prepared, the 1X Wash solution can be stored at 2-8 °C for up to 7 days.

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 Wash solution carefully. Allow to stand for a minute and mix well. Prepare immediately 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 remaining conjugate can be aliquoted in eppendorf type tubes and stored at -20°C (cannot be stored in the refrigerator)

for) for up to 3 months. During this period of time each aliquot can be thaw and re-frozen one time.

### 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 (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

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

Controls (PC and NC) should be diluted 1:400 using the Sample diluent.

Add 2 µl of the corresponding control to 800 µl of Sample diluent (dilution 1:400) and mix well. Use 100 µl of each diluted control per well and in duplicate.

### 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

Samples should be diluted 1:400 using the Sample diluent.


Add 2 µl of the sample (serum or plasma) to 800 µl of Sample diluent (dilution 1:400) and mix well. Use 100 µl of the diluted sample per well.

### Notes:


-It is recommended to analyze serum or plasma (obtained using heparin, sodium citrate or EDTA as anticoagulant) samples recently obtained (fresh) and free of turbidity.

-If the samples contain particles or a high content of triglycerides, they should be clarified by centrifugation.

-If the samples are not analyzed immediately, they can be kept refrigerated (2 to 8 °C) for



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Clocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

up to 72 hs. For longer storage, store at -20°C (-15 to -20°C), taking into account that during storage and as a consequence of the freezing and thawing process, the antibody titer may change. If samples are frozen, they must be completely thawed, homogenized and centrifuged before testing.

-It is recommended to analyze the samples at least in duplicate.

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

## Test procedure

1. Allow the reagents equilibrate to room temperature (20-25°C). Do not remove the plate from its pouch until it has reached room temperature. If the entire plate is not used, separate only the 8-well strips needed to analyze the controls and samples. Store the rest of the strips, 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 stored in the hermetically sealed polyethylene bag with the desiccants, and in the refrigerator (2-8°C) for up to 4 months, as long as the indicated expiration date is not exceeded.

2. Add in duplicate 100 µl per well of the positive control, negative control and sample blank. See Item Preparation of controls.

3. Add 100 µl per well of each serum sample. See Item Sample preparation.

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

5. Wash/rinse the plates 4 times with 200 µl of 1X Wash Solution per well. See item Reagents preparation.

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

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

7. Repeat step 5.

8. Add 100 µl of Substrate-chromogen solution to each well, and incubated with gentle orbital shaking for 10 minutes ( $\pm 1$  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 ( $PR_{PC} = 100\%$ ) with respect to the positive control included in each test. The absorbance values measured at 450 nm ( $Abs_{450}$ ) of each sample are related to the  $Abs_{450}$  value of the positive control (PC) as follows:

$$PR_{SAMPLE} = \frac{Abs_{450} \text{ Sample}^*}{\text{Average } Abs_{450} \text{ PC}} \times 100$$

\* If the sample was run in duplicate, consider the average of the  $Abs_{450}$  value.

### Validity criteria

To confirm the validity of the test the following criteria must be met:

- The average value of the PC ( $Abs_{450}$ ) must be higher than 1.6 ( $Abs_{450} \text{ PC} > 1.6$ ).
- The  $Abs_{450}$  values of the controls (PC and NC) and samples duplicates must not dif-



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Ciochini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

fer by more than 20% of the corresponding average.

- The Abs<sub>450</sub> values of the blank sample must be less than 0.1 (Abs<sub>450</sub> Blank sample < 0.1).
- The average Abs<sub>450</sub> value of the NC must be less than 0,15 (Average Abs<sub>450</sub> NC < 0.15).
- The Average Abs<sub>450</sub> PC / Average Abs<sub>450</sub> NC ratio must be higher than 10 (Average Abs<sub>450</sub> PC / Average Abs<sub>450</sub> NC > 10).

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:

Sample (dilution 1:400)

PR	Interpretation
≤ 34%	Non-Reactive
> 34 ≤ 52%	Indeterminate
> 52%	Reactive

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.

### Performance characteristics

#### Diagnostic sensitivity and specificity

More than 390 serum samples obtained from patients with brucellosis caused by *B. abortus*, *B. melitensis* or *B. suis*, and from healthy donors 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. The cut-off value that simultaneously maximized the Se and Sp (maximum value of the Youden's index, J) matches the cut-off value for which the Se is 100%.

**Table 1**

Sensitivity, specificity and Youden's index.

Valor de corte (PR) <sup>a</sup>	Se (%) <sup>b</sup>	Sp (%) <sup>b</sup>	J <sup>c</sup>
34	100 (95,3 - 100)	99,4 (97,7 - 99,9)	<b>0,994</b>
52	91,0 (82,2 - 96,3)	100 (98,8 - 100)	0,909

(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).

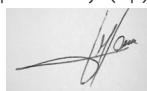
#### Hook effect

Based on the analysis of samples with high titers of specific anti-Brucella antibodies, it was determined that the CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA kit does not have a hook effect in the detection of IgG antibodies.

#### Cross reactivity

Cross-reactivity of CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA was evaluated by testing clinical samples obtained from patients with other conditions. Samples with positive serology obtained from patients with the following diseases or bacterial, parasitic, and viral infections were analyzed:

-Bacterial: *Escherichia coli* O157, O145 and O121 infections, Tuberculosis, Syphilis, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* infections.



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Ciocchini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

-Viral: Dengue, VHB, VHC, HTLV I/II, HIV, Hantavirus.

-Parasitic: Chagas, Leishmaniasis y Toxoplasmosis.

-Autoimmune diseases: rheumatoid arthritis, Systemic Lupus Erythematosus and autoimmune vasculitis.

CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA has a high level of specificity since no cross-reactivity was observed with any of the samples obtained from patients with other conditions or bacterial, viral or parasitic infections.

#### *Interfering substances*

The following potentially interfering substances have no impact on the performance of CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA (final test concentrations of interfering substances are indicated in parentheses):

-Oxalic acid (0.6 mg/ml)

-Bovine albumin (20 mg/ml)

-Human Immunoglobulin G (hIgG) (2 mg/ml)

-Human Immunoglobulin M (hIgG) (2 mg/ml)

-Human Immunoglobulin A (hIgG) (2 mg/ml)

-Cholesterol (5 mg/ml)

-Hemoglobin (10 mg/ml)

-Bilirubin (2 mg/ml)

#### *Repeatability and Reproducibility*

Repeatability and reproducibility of CHEMLIS® Brucella Glyco-iELISA was established using in-house reference panels containing negative specimens and a range of positive specimens. There were no differences observed within-run, between-run, between-lots, between-sites, and between-days.

#### **For technical assistance**

Tel: (54-11) 5353-6066

info@chemtest.net

chemtest.net

#### **Referencias / References**

-Andrés E. Ciochini, Diego A. Rey Serantes, Luciano J. Melli, Jeremy A. Iwashiki, Bettina Deodato, Jorge Wallach, Mario F. Feldman, Juan E. Ugalde and Diego J. Comerçi.

Development and Validation of a Novel Diagnostic Test for Human Brucellosis Using a Glyco-engineered Antigen Coupled to Magnetic Beads.

PLoS Negl Trop Dis. 2013 Feb;7(2):e2048. doi:10.1371/journal.pntd.0002048.



Juan Manuel Capece  
Presidente












Andrés E. Ciochini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227

■ **Chemtest Argentina S. A.**

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

info@chemtest.net - chemtest.net

## Indice de símbolos / Symbol index

	Fecha de vencimiento / Expiration date
	Número de catálogo / Catalog number
	Lote / Batch code
	Para diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use only
	Límites de temperatura / Temperature limits
	Consultar instrucciones para su uso / See instructions for use
	Número de determinaciones / Number of determinations
	Fabricante / Manufacturer
	Riesgo biológico / Biological risk



Juan Manuel Capece  
Presidente



Andrés E. Ciochini  
Director Técnico  
Matrícula Número 7227



ELISA



Humanos



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



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
Las Malvinas son argentinas

**Hoja Adicional de Firmas**  
**Informe gráfico**

**Número:**

**Referencia:** RÓTULOS Y MANUAL DE INSTRUCCIONES 2 EX-2021-85838687- -APN-DGA#ANMAT

---

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 23 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica  
Date: 2022.10.25 10:00:30 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental  
Electronica  
Date: 2022.10.25 10:00:31 -03:00



**República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional**  
Las Malvinas son argentinas

**Documentación varia**

**Número:**

**Referencia:** BPF VIGENTE EX-2021-85838687- -APN-DGA#ANMAT

---

Se adjunta como archivo embebido la BPF de la empresa CHEMTEST ARGENTINA por estar firmado digitalmente.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica  
Date: 2022.10.24 13:43:20 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental  
Electronica  
Date: 2022.10.24 13:43:21 -03:00





**Ministerio de Salud**  
Secretaria de Calidad en Salud  
A.N.M.A.T.

**INSTITUTO NACIONAL DE PRODUCTOS MEDICOS**  
**CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE BUENAS PRACTICAS DE FABRICACION DE PRODUCTOS MEDICOS**  
**Y PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO**  
(Disposición ANMAT N° 7425/13)

REVISIÓN N°: **2360-00**

ESTADO PARTE: **ARGENTINA**  
NÚMERO DE CERTIFICADO: **78-2022-R**  
RAZÓN SOCIAL DEL ESTABLECIMIENTO: **CHEMTEST ARGENTINA SA**  
DOMICILIO LEGAL: **Campus Miguelete, Universidad Nacional de San Martín, Av. 25 de mayo 1021, Edificio de la Fundación Argentina de Nanotecnología., San Martín, Buenos Aires**  
LEGAJO N°: **2360**

Planta Elaboradora	Campus Miguelete, Universidad Nacional de San Martín, Av. 25 de mayo 1021, Edificio de la Fundación Argentina de Nanotecnología., San Martín, Buenos Aires
Depósito	Campus Miguelete, Universidad Nacional de San Martín, Av. 25 de mayo 1021, Edificio de la Fundación Argentina de Nanotecnología., San Martín, Buenos Aires

El establecimiento cumple con los requisitos de las Buenas Prácticas de Fabricación (Resolución GMC 20/11 incorporada por Disposición ANMAT N° 3266/13) para la/s siguiente/s categoría/s y clase/s de riesgo de productos médicos:

actividad	Categoría	Clases
FABRICANTE	PRODUCTOS MEDICOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO	A - B - C - D
IMPORTADOR	PRODUCTOS MEDICOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO	A - B - C - D

FECHA DE EMISIÓN: **21 de julio de 2022**  
PLAZO DE VALIDEZ: **5 (CINCO) AÑOS.**

El plazo de vencimiento no invalida la posibilidad de realizar verificaciones de rutina de BPF en cualquier momento, en las situaciones previstas por la reglamentación.



La validez del presente documento deberá verificarse mediante el código QR.