



# PROTOCOLLO PARA BRUCELLA



**Warning: Document only for Training use.  
Does not replace the User Manual.**

PIONEERING DIAGNOSTICS

## KB version 3.2

### ● 9 especies de Brucella:

- *Brucella abortus*
- *Brucella canis*
- *Brucella ceti*
- *Brucella inopinata*
- *Brucella melitensis*
- *Brucella ovis*
- *Brucella papionis*
- *Brucella pinnipedialis*
- *Brucella suis*

### ● **ADVERTENCIA:** Resultados de Brucella se ven como *Brucella spp.*

- **Se requiere una fase de inactivación para las especies de Brucella, ya que son organismos BSL3**
  
- **Precauciones necesarias:**
  - Todas las manipulaciones de **Brucella** deben realizarse utilizando una Cabina de Seguridad Biológica (Tipo IIA) con filtros HEPA certificados
  - Diagnóstico difícil: mientras que el cultivo es el estándar de oro, Brucella spp. pueden ser fastidiosos, de crecimiento lento. El cultivo de muestras primarias puede requerir hasta **21 días de incubación**.
  - Una vez que se reconoce una potencial exposición, la primera tarea es determinar las actividades realizadas que pueden haber conducido a la exposición. Identificar:
    - 1. ¿Quién estuvo en el laboratorio durante el tiempo o los tiempos de exposición sospechosos?
    - 2. ¿Dónde estaban en relación con la exposición?
    - 3. ¿Qué hicieron con los aislados?
    - 4. ....,

## ● **Reactivos y consumibles necesarios para la preparación de la solución para la inactivación de Brucella**

- Etanol absoluto (grado HPLC)
- Acetonitrilo (grado HPLC)
- Ácido trifluoroacético (TFA) (grado HPLC)
- Medio de suspensión API - Ref 70700 o agua Desionizada
- Pipetas de precisión aptas para 1 mL y 10 mL
- Microtubos incoloros de fondo redondo de 2 mL

## ● **Equipamiento**

- Microcentrífuga capaz de alcanzar 14.000 g apta para tubos de 2 mL
- Mezclador tipo vórtice con adaptador u homogeneizador tipo batidor de perlas
- Cabina de bioseguridad
- Vórtex (velocidad máxima)

# REQUISITOS DE CULTIVO, CEPA QC

- **Requisitos de cultivo: 48 – 96 horas**
- **Cepa de control de calidad: *Brucella melitensis* ATCC® 23456™**
- **Lista de medios de cultivo validados**
  - Brucella Agar base
  - Agar sangre de carnero 5% Columbia

# PROTOCOLO BRUCELLA

## ETAPAS 1/2



### 3 etapas:

- **Preparación de solución de inactivación fresca (preparar diariamente)**
- **Fase de inactivación**
- **Depósito de preparación de muestras**

# PROTOCOLO BRUCELLA

## ETAPAS 1/2



### PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE INACTIVACIÓN (Debe ser preparado diariamente)

En un vial de vidrio limpio mezcle:  
-7 ml de medio de suspensión o agua desionizada estéril  
-7 mL de Etanol Absoluto (grado HPLC)  
-7 mL de Acetonitrilo (grado HPLC)

#### Homogenizar

Luego agregue 630 µL de ácido trifluoroacético (grado HPLC)

#### Homogenizar

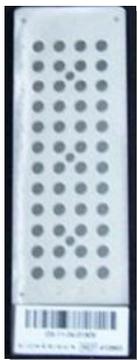
### DEPÓSITO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Depositar 1 µl de preparación final



Secar completamente

**No es necesario agregar la matriz CHCA**



### FASE DE INACTIVACIÓN



Resuspender con vortex, 2 ansas llenas de 1 µl de cultivo en 200 µl de solución de inactivación.



Vortex 5 min a máxima velocidad usando adaptadores para tubos de microcentrifuga

Incubar a temperatura ambiente 10 min

Centrifugación 2 min 14 000G

Descartar todo el sobrenadante

**Realizar bajo cabina de seguridad**

Agregar 10 µl de matriz CHCA sin PERTURBAR EL PELLET



**No vortexear, No resuspender**

# PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE INACTIVACIÓN

- La solución de inactivación debe prepararse diariamente y no puede almacenarse
- Se puede realizar fuera de la cabina de seguridad
- Homogeneizar correctamente



## **PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE INACTIVACIÓN (Debe ser preparado diariamente)**

En un vial de vidrio limpio mezcle:

- 7 ml de medio de suspensión o agua desionizada estéril
- 7 mL de Etanol Absoluto (grado HPLC)
- 7 mL de Acetonitrilo (grado HPLC)

**Homogenizar**

Luego agregue 630  $\mu$ L de ácido trifluoroacético (grado HPLC)

**Homogenizar**

# FASE DE INACTIVACIÓN 1/4



- A realizar bajo cabina de seguridad
- Tomar 2 ansadas completas de 1  $\mu\text{L}$  de cultivo y resuspender por vórtex en un tubo de fondo redondo de 2 mL que contiene 200  $\mu\text{L}$  de mezcla de inactivación
- Vórtex durante 5 min a máxima velocidad utilizando GENIE 2 Vortex + adaptador de espuma (VWR ref 444-5914)



Foam adaptor

- Incubar a temperatura ambiente durante 10 min para una inactivación eficiente

# FASE DE INACTIVACIÓN 2/4



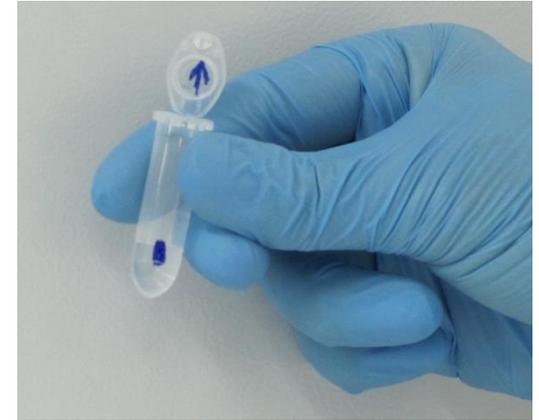
Centrifugación  
2 min  
14 000 G



- La centrifugación requiere microcentrífuga
- Pellet podría no ser visible.
- Coloque siempre los tubos de la misma manera en la centrífuga para saber dónde se encuentra el sedimento (parte inferior del tubo, posición superior).

# FASE DE INACTIVACIÓN 3/4

Descartar el  
sobrenadante con  
pipeta

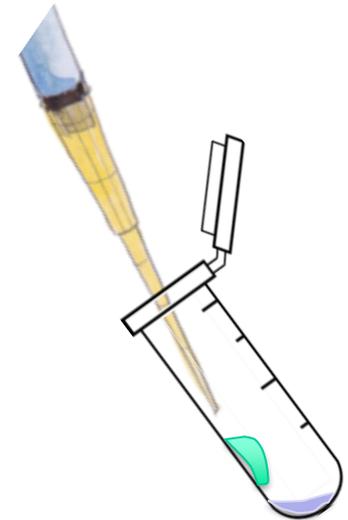
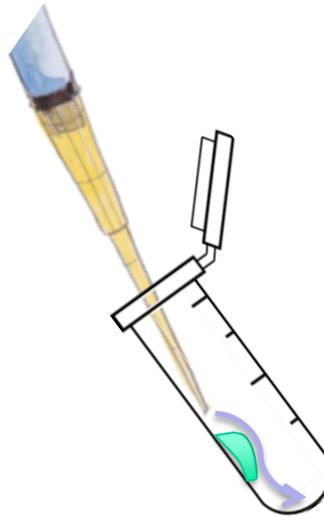


- Este paso debe realizarse bajo cabina de seguridad.
- Pipetear en el lado opuesto del sedimento
- Pipetear lentamente evitando perturbar el sedimento
- Retire todo el líquido, puede interferir con la extracción.

# FASE DE INACTIVACIÓN 4/4

10  $\mu$ l Matriz CHCA

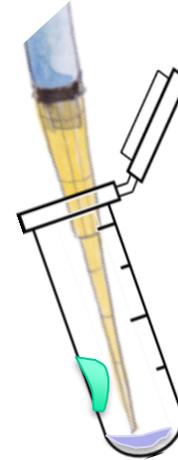
Agregar 10  $\mu$ l de  
matriz CHCA SIN  
PERTURBAR EL  
PELLET



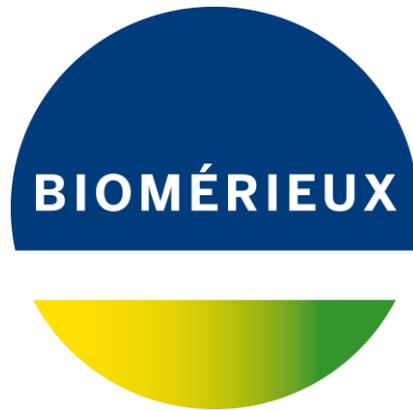
- Añadir 10  $\mu$ l de matriz CHCA SIN PERTURBAR el sedimento
- No VORTEXEAR, ni resuspender
- La suspensión obtenida contiene suficiente proteínas para la identificación

# DEPÓSITO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Pipetee 1  $\mu$ L de la suspensión



- Pipetear 1  $\mu$ l de suspensión y depositar en el portaobjetos
- Dejar secar por completo
- No es necesario agregar CHCA Matrix ya que está presente en la suspensión
- La preparación se puede almacenar 1 día a 4 - 8 ° C en un tubo limpio



PIONEERING DIAGNOSTICS