

Generalidades

Kit de diagnóstico para detectar anticuerpos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP).

Se puede utilizar con muestras de suero o de plasma caprino, ovino o bovino (vacca o búfalo) o con muestras de leche bovina (individual o mezcla).

Este documento describe el procedimiento para el test de muestras de suero y plasma. Para las muestras de leche, seguir instrucciones según protocolo adjunto (« Protocolo 2 /2 »).

Descripción y principio

El método utilizado es descrito en las recomendaciones del OIE (Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements volume III – Paratuberculosis 5B/009).

Los pocillos son sensibilizados con el extracto purificado de MAP. Para evitar reacciones cruzadas, previamente las muestras son pre-incubadas con un tampón de neutralización que contiene *Mycobacterium phlei* (Diluyente 6) y después son transferidas a las placas sensibilizadas con el antígeno.

En presencia de anticuerpos (anti-MAP) se formará un complejo antígeno-anticuerpo.

Las placas se lavan y se dispensa el conjugado anti-rumiante peroxidasa (HRP). En presencia de anticuerpos anti-MAP se formará un complejo antígeno-anticuerpo-conjugado-HRP.

Después de la eliminación del conjugado en exceso, la reacción es revelada con la Solución de Revelación (TMB).

La coloración que resulta está vinculada a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra a valorar:

- En presencia de anticuerpos, aparece una coloración azul que se convierte en amarillo después de la adición de la Solución de Parada.
- En ausencia de anticuerpos en la muestra, no aparece ninguna coloración.

La microplaca se lee a una longitud de onda de 450 nm.

Componentes

Reactivos*
Microplacas sensibilizadas con un extracto purificado de MAP
Conjugado concentrado (10X)
Control Positivo
Control Negativo
Diluyente 6
Diluyente 3
Solución de lavado concentrada (20X)
Solución de revelación (TMB)
Solución de parada (0.5 M)

*Las cantidades que se suministran están indicadas en la etiqueta del kit

1. El diluyente 6, el conjugado, los controles y la solución de revelación deben conservarse a 5°C (\pm 3°C)
2. El resto de reactivos pueden conservarse de +2°C y +26°C.
3. Las soluciones de lavado, de revelación y de parada pueden ser utilizadas para toda la gama de productos de IDvet. Los diluyentes con el mismo número de lote son intercambiables.

Si fuese necesario, IDvet suministraría volúmenes suplementarios de los reactivos.

Materiales necesarios no incluidos

1. Micropipetas o pipetas multicanales dispensadoras de volúmenes de 10 μ l, 100 μ l, y 200 μ l.
2. Puntas de pipetas
3. Lector de placas para ELISA
4. Agua destilada o desionizada
5. Lavador de placas (manual o automático)
6. Microplacas de pre-dilución de 96 pocillos.

Precauciones de uso

1. No pipetear con la boca.
2. La solución de revelación puede ser irritante para la piel.
3. La Solución de Parada (0,5M) puede ser peligrosa en caso de ingestión y puede causar sensibilización en contacto con la piel (**R22-43**). Evitar el contacto con la piel (**S24-37**).
4. No exponer la Solución de revelación a la luz o a agentes oxidantes.
5. Todos los reactivos deben ser descontaminados adecuadamente antes de ser eliminados. Eliminar los productos de acuerdo a la reglamentación en vigor.

Preparación de la solución de lavado

Es necesario equilibrar la Solución de lavado concentrada (**20X**) a temperatura ambiente (21°C \pm 5°C) y agitar correctamente para obtener la disolución de los cristales. Preparar la Solución de lavado (**20X**) anterior al (**1X**) diluyéndola con agua destilada/desionizada.

Los resultados pueden ser influenciados dependiendo de la calidad del lavado. Asegúrese que los pocillos se encuentren completamente vacíos entre cada lavado. Si utiliza una máquina de lavado automática, es de suma importancia ajustar correctamente los parámetros (modo, tipo y altura de aspiración). Para mayor información, sírvase contactar info@id-vet.com y solicitar la "Guía de lavado" de IDvet.

Procedimiento para suero o plasma

Mantener los reactivos a temperatura ambiente (21°C \pm 5°C) antes de utilizarlos. Homogeneizarlos por Vórtex o por inversión.

Se pueden utilizar con una incubación corta o larga (de noche).

1. En una microplaca de pre-dilución de 96 pocillos, se diluyen las muestras al 1:12 con el **Diluyente 6**. Distribuir:
 - 10 μ l del **Control Negativo** en los pocillos A1 y B1.
 - 10 μ l del **Control Positivo** en los pocillos C1 y D1.
 - 10 μ l de cada muestra a analizar en los pocillos restantes.
 - 110 μ l del **Diluyente 6** en todos los pocillos.

Nota: existe la posibilidad de trabajar con volúmenes superiores de diluyente y de muestra; siempre y cuando se respete las proporciones descritas abajo (por ejemplo, 15 μ l de muestra + 165 μ l de diluyente 6 para el protocolo de suero). Si necesita, IDvet tiene a su disposición frascos adicionales de diluyente 6.

2. Incubar entre **5 min y 45 min** a 21°C (\pm 5°C).
3. Transferir 100 μ l de los controles y las muestras neutralizadas a las microplacas ELISA sensibilizadas.
4. Cubrir la placa e incubar **45 min \pm 4 min** a 21°C (\pm 5°C) (incubación corta) o durante **la noche entre 16 y 20 horas** (incubación nocturna) a 5°C (\pm 3°C).
5. Vaciar los pocillos y lavarlos 3 veces con aproximadamente 300 μ l de la **Solución de lavado**. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados.
6. Preparar el **Conjugado 1X** diluyendo el **Conjugado 10X** al 1:10 (incubación corta) o al 1:25 (incubación nocturna) con el **Diluyente 3**.
7. Distribuir 100 μ l del **Conjugado 1X** a todos los pocillos.
8. Cubrir la placa e incubar **30 min \pm 3 min** a 21°C (\pm 5°C).
9. Vaciar los pocillos y lavarlos 3 veces con aproximadamente 300 μ l de la Solución de lavado. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados.
10. Distribuir 100 μ l de **Solución de revelación** a todos los pocillos.
11. Incubar **15 min \pm 2 min** a 21°C (\pm 5°C) en la oscuridad.
12. Distribuir 100 μ l de **Solución de parada** a todos los pocillos para detener la reacción.
13. Leer la densidad óptica a 450 nm.

Validación

Se valida el ensayo si:

- ✓ la densidad óptica media del Control Positivo (DO_{CP}) es superior a 0.350.

$$DO_{CP} > 0.350$$

- ✓ la proporción entre las densidades ópticas medias de los Controles Positivos y Negativos (DO_{CP} y DO_{CN}) es superior a 3.

$$DO_{CP}/DO_{CN} > 3$$

Interpretación

Para cada muestra, calcular el porcentaje S/P (S/P%):

$$S/P \% = \frac{DO_{muestra} - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \times 100$$

Suero o plasma caprino, ovino o bovino:

Muestras con un S/P%:

- inferior o igual a 60 % son consideradas negativas;
- superior a 60% e inferior a 70% son consideradas dudosas;
- superior o igual a 70 % son consideradas positivas.

Resultado	
S/P% ≤ 60%	NEGATIVO
60% < S/P% < 70%	DUDOSO
S/P% ≥ 70%	POSITIVO

Nota: El programa para el análisis de datos ID Soft™, se encuentra disponible gratuitamente en nuestra página web: <http://www.id-vet.com/support/software>

Este programa informático permite calcular los diferentes parámetros del kit (criterios de validación, valores S/P, títulos, determinación de la edad de vacunación, grupos) y asimismo propone una síntesis gráfica de los perfiles serológicos de los animales analizados.

ID Screen® Paratuberculosis Indirect Screening test



N° de autorización del ministerio español: 1289-RD

Protocolo 1 / 2

Muestras de suero y plasma

Para las muestras de leche, seguir instrucciones según protocolo 2 /2

Incubación corta o nocturna

Utilización *in vitro*

PARAS ver 0516 ES

Generalidades

Kit de diagnóstico para detectar anticuerpos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP).

Se puede utilizar con muestras de suero o de plasma caprino, ovino o bovino (vacca o búfalo) o con muestras de leche bovina (individual o mezcla).

Este documento describe el procedimiento para el test de muestras de leche. Para las muestras de suero y plasma, seguir instrucciones según protocolo adjunto (« Protocolo 1 /2 »).

Descripción y principio

El método utilizado es descrito en las recomendaciones del OIE (Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements volume III – Paratuberculosis 5B/009).

Los pocillos son sensibilizados con el extracto purificado de MAP. Para evitar reacciones cruzadas, previamente las muestras son pre-incubadas con un tampón de neutralización que contiene *Mycobacterium phlei* (Diluyente 6) y después son transferidas a las placas sensibilizadas con el antígeno.

En presencia de anticuerpos (anti-MAP) se formará un complejo antígeno-anticuerpo.

Las placas se lavan y se dispensa el conjugado anti-rumiante peroxidasa (HRP). En presencia de anticuerpos anti-MAP se formará un complejo antígeno-anticuerpo-conjugado-HRP.

Después de la eliminación del conjugado en exceso, la reacción es revelada con la Solución de Revelación (TMB).

La coloración que resulta está vinculada a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra a valorar:

- En presencia de anticuerpos, aparece una coloración azul que se convierte en amarillo después de la adición de la Solución de Parada.
- En ausencia de anticuerpos en la muestra, no aparece ninguna coloración.

La microplaca se lee a una longitud de onda de 450 nm.

Componentes

Reactivos*
Microplacas sensibilizadas con un extracto purificado de MAP
Conjugado concentrado (10X)
Control Positivo
Control Negativo
Diluyente 6
Diluyente 3
Solución de lavado concentrada (20X)
Solución de revelación (TMB)
Solución de parada (0.5 M)

*Las cantidades que se suministran están indicadas en la etiqueta del kit

1. El diluyente 6, el conjugado, los controles y la solución de revelación deben conservarse a 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$)
2. El resto de reactivos pueden conservarse de +2°C y +26°C.
3. Las soluciones de lavado, de revelación y de parada pueden ser utilizadas para toda la gama de productos de IDvet. Los diluyentes con el mismo número de lote son intercambiables.

Si fuese necesario, IDvet suministraría volúmenes suplementarios de los reactivos.

Materiales necesarios no incluidos

1. Micropipetas o pipetas multicanales dispensadoras de volúmenes de 10 μl , 100 μl , y 200 μl .
2. Puntas de pipetas
3. Lector de placas para ELISA
4. Agua destilada o desionizada
5. Lavador de placas (manual o automático)
6. Microplacas de pre-dilución de 96 pocillos.

Precauciones de uso

1. No pipetear con la boca.
2. La solución de revelación puede ser irritante para la piel.
3. La Solución de Parada (0,5M) puede ser peligrosa en caso de ingestión y puede causar sensibilización en contacto con la piel (**R22-43**). Evitar el contacto con la piel (**S24-37**).
4. No exponer la Solución de revelación a la luz o a agentes oxidantes.
5. Todos los reactivos deben ser descontaminados adecuadamente antes de ser eliminados. Eliminar los productos de acuerdo a la reglamentación en vigor.

Preparación de la solución de lavado

Es necesario equilibrar la Solución de lavado concentrada (**20X**) a temperatura ambiente ($21^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$) y agitar correctamente para obtener la disolución de los cristales. Preparar la Solución de lavado (**20X**) anterior al (**1X**) diluyéndola con agua destilada/desionizada.

Los resultados pueden ser influenciados dependiendo de la calidad del lavado. Asegúrese que los pocillos se encuentren completamente vacíos entre cada lavado. Si utiliza una máquina de lavado automática, es de suma importancia ajustar correctamente los parámetros (modo, tipo y altura de aspiración). Para mayor información, sírvase contactar info@id-vet.com y solicitar la "Guía de lavado" de IDvet.

Procedimiento para muestras de leche

Mantener los reactivos a temperatura ambiente ($21^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$) antes de utilizarlos. Homogeneizarlos por Vórtex o por inversión.

Se pueden utilizar con una incubación corta o larga (de noche).

Centrifugar cada muestra de leche o dejarla reposar, con la finalidad de separar la crema del lactosuero (crema en la parte superior, lactosuero en la parte inferior):

Pipetear debajo de la crema para que sólo el lactosuero ingrese en el cono (los anticuerpos se encuentran en el lactosuero).

1. En una microplaca de pre-dilución de 96 pocillos, se diluyen las muestras al 1:2 y los controles positivos y negativos al 1:12 con el **Diluyente 6**.

Distribuir:

- 10 μl del **Control Negativo** y 110 μl del **Diluyente 6** en los pocillos A1 y B1.
 - 10 μl del **Control Positivo** y 110 μl del **Diluyente 6** en los pocillos C1 y D1.
 - 80 μl del **Diluyente 6** y 80 μl de cada muestra a analizar en los pocillos restantes.
2. Incubar entre **5 min y 45 min** a 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$).
 3. Transferir 100 μl de los controles y las muestras neutralizadas a las microplacas ELISA sensibilizadas.
 4. Cubrir la placa e incubar **45 min \pm 4 min** a 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) (incubación corta) o durante **la noche entre 16 y 20 horas** (incubación nocturna) a 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$).
 5. Vaciar los pocillos y lavarlos 3 veces con aproximadamente 300 μl de la Solución de lavado. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados. *Tener cuidado que no haya restos de grasa de la leche (círculo blanco) en los pocillos después del lavado. Para evitar los residuos grasosos, es posible dejar un tiempo de contacto de 2 a 5 minutos entre cada lavado.*
 6. Preparar el **Conjugado 1X** diluyendo el **Conjugado 10X** al 1:10 (incubación corta) o al 1:25 (incubación nocturna) con el **Diluyente 3**.
 7. Distribuir 100 μl del **Conjugado 1X** a todos los pocillos.
 8. Cubrir la placa e incubar **30 min \pm 3 min** a 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$).
 9. Vaciar los pocillos y lavarlos 3 veces con aproximadamente 300 μl de la **Solución de lavado**. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados.
 10. Distribuir 100 μl de **Solución de revelación** a todos los pocillos.
 11. Incubar **15 min \pm 2 min** a 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) en la oscuridad.
 12. Distribuir 100 μl de **Solución de parada** a todos los pocillos para detener la reacción.
 13. Leer la densidad óptica a 450 nm.

Validación: suero y de leche

Se valida el ensayo si:

- ✓ la densidad óptica media del Control Positivo (DO_{CP}) es superior a 0.350.

$$DO_{CP} > 0.350$$

- ✓ la proporción entre las densidades ópticas medias de los Controles Positivos y Negativos (DO_{CP} y DO_{CN}) es superior a 3.

$$DO_{CP}/DO_{CN} > 3$$

Interpretación

Para cada muestra, calcular el porcentaje S/P (S/P%):

$$S/P \% = \frac{DO_{muestra} - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \times 100$$

Leche bovina, muestras individuales:

Muestras con un S/P%

- inferior o igual a 30 % son consideradas negativas
- superior a 30 % son consideradas positivas.

Resultado	Status
S/P % ≤ 30%	NEGATIVO
S/P % > 30%	POSITIVO

Leche bovina, muestras mezclas:

Muestras con un S/P%

- inferior o igual a 15 % son consideradas negativas
- superior a 15 % son consideradas positivas

Resultado	Status
S/P % ≤ 15%	NEGATIVO
S/P % > 15%	POSITIVO

Nota: El programa para el análisis de datos ID Soft™, se encuentra disponible gratuitamente en nuestra página web: <http://www.id-vet.com/support/software>

Este programa informático permite calcular los diferentes parámetros del kit (criterios de validación, valores S/P, títulos, determinación de la edad de vacunación, grupos) y asimismo propone una síntesis gráfica de los perfiles serológicos de los animales analizados.

ID Screen® Paratuberculosis Indirect Screening test



Nº de autorización del ministerio español: 1289-RD

Protocolo 2 / 2

Muestras de leche

Para las muestras de suero y plasma, seguir instrucciones según protocolo 1 / 2

Utilización *in vitro*

Mayo 2016:

➤ **Incubación de noche añadida**

Marzo 2015:

➤ **Nuevo cut-off para leches individuales (30% en lugar de 15%)**

PARAS ver 0516 ES