



PARATB

Referencia: ADL04Y1-100

Prueba para la detección y cuantificación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante amplificación enzimática en tiempo real

Test PCR – 100 reacciones

Para uso veterinario *in vitro* únicamente



Muestra	Análisis individual	Grupo de muestras*, hasta:
Heces	✓	4
Muestras ambientales (raspado de estiércol de vaca, zonas de espera...)	✓	✗
Leche	✓	✗
Cultivo bacteriano	✓	✗
Tejido (ganglio, mucosa, válvula ileocecal)	✓	✗

*En función del caso epidemiológico y de la calidad de las muestras.

Composición del kit

Contenido		Kit ADL04Y1-100
		100 reacciones
A6	Solución de amplificación	1 frasco liofilizado (para reconstituir)
Rehydration buffer	Solución de rehidratación	1 x 6 mL frasco (reactivo listo para usar)
PARATB CTL+	Control positivo <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
EPC-Ext	Control de extracción exógena	1 frasco con tapón amarillo (para reconstituir)
NF-Water	Agua sin nucleasas	2 x 1000 µL tubos con tapón blanco (reactivo listo para usar)

Historial de revisiones

Fecha	Versión	Modificaciones
03/2024	V01	Creación

Nota: las modificaciones menores de tipografía, gramática y maquetación no aparecen en el historial de revisiones.

A. Introducción

La paratuberculosis es una enfermedad contagiosa y mortal que afecta principalmente a rumiantes domésticos como las ovejas, las vacas y las cabras. También se la denomina «enfermedad de Johne». La enfermedad de Johne está causada por la bacteria *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP), que se multiplica en los intestinos y se excreta en las heces. El nivel de contaminación de las heces evoluciona en función de la enfermedad, de algunas bacterias por gramo de heces en las primeras fases de la infección, hasta de 10^4 a 10^{10} bacterias por gramo de heces en la fase clínica (Collins *et al.*, 1993). A continuación, la bacteria puede diseminarse en el organismo del animal a través de los macrófagos; llegado a este punto, es posible la contaminación a través del calostro, la leche y el semen.

La detección de la MAP mediante cultivo es larga y laboriosa (6-8 semanas). Por lo tanto, la PCR es el método más rápido y específico para la detección de MAP.

La cuantificación del nivel de contaminación es interesante para clasificar a los animales e identificar a los que más excretan.

La prueba ADIALYO™ PARATB REAL TIME puede utilizarse para realizar cualquiera de las siguientes pruebas:

- Una PCR cualitativa.
- Una PCR cuantitativa. El Paratb CTL+ se utiliza para producir una curva estándar (equivalente genoma/gramo de heces).
- Una prueba PCR relativa a la utilización de unas heces positivo cuantificado de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, suministrada previa solicitud (ref. ADC04SQ01).

B. Principio de la prueba

El test ADIALYO™ PARATB REAL TIME se basa en la amplificación génica de fragmentos de ADN específicos de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Esta prueba puede detectar simultáneamente y en un único pocillo:

- *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (sonda marcada con FAM).
- Un control interno exógeno (sonda marcada en HEX o equivalente):
 - De extracción o de amplificación si el EPC-Ext se añade a cada muestra durante la extracción de ácidos nucleicos.
 - De amplificación si el EPC-Ext se añade a la solución de amplificación.

C. Condiciones de conservación

Tras su recepción, conservar el kit a +2/8 °C en un lugar seco. Los reactivos reconstituídos deben alicuotarse y conservarse a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit. Conservar protegido de la luz. No descongelar más de 3 veces.

D. Material necesario pero no suministrado

- Termociclador con consumibles para PCR en tiempo real.
- Dispositivo de homogeneización para tubos.
- Pipetas de 1 - 10 µL, 20 - 200 µL y 200 - 1 000 µL.
- Conectores sin nucleasas con filtros para micropipetas.
- Microtubos sin nucleasas de 1,5 mL y 2 mL.
- Guantes de látex o nitrilo sin polvo.
- Agua sin nucleasas.
- Sistema de pre-filtración: ADIAPREP™ (Bio-X Diagnostics, ref. ADPREP-200 (200 tests))
- Esferas de trituración:

Para molino mezclador de tipo Mixer Mill:

- ADIAPURE™ ALIQUOTED GLASS BEADS (Bio-X Diagnostics, ref. ADIADPBI-480 (480 tests)).
- ADIAPURE™ GLASS BEADS RACKS 4x96 (Bio-X Diagnostics, ref. ADPBIAR-4x96 (384 tests)).

Para Fast Prep o Ribolyser:

- Lysing Matrix B (MP biomedical, 100 tubos, ref. 116911100).

- Kit de extracción de ácidos nucleicos.

Kits complementarios para adopción de métodos y PCR (U47-600)

- **Quantified Extraction Positive Control PARATB Faecal (Ref.: ADC04SQ01).** Heces positivas a la extracción cuantificadas en PARATB para identificar positivos altos (calibrados a 10000 EG/gramo de heces según Kralik, P. *et al.*, 2014 Beinhauerova, M. *et al.*, 2021). El EPCQ es también un material de referencia de proveedor para la adopción de métodos.
- **LDpqr Positive Control – PARATB (Ref.: ADC04YLD)** Confirmación de rendimientos – LDpqr et LQpqr del kit.
- **Extraction Positive Control PARATB (Ref.: ADC04EPC).** Material de referencia de proveedor para la adopción de método que también puede utilizarse como centinela (Calibrado entre 1 y 100 x LD_{método}).

E. Advertencias y precauciones

- Sólo para uso veterinario *in vitro*.
- Sólo para uso animal.
- Sólo para uso profesional.
- Todas las instrucciones deben leerse antes de realizar la prueba y respetarse estrictamente.
- No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad.
- No utilizar reactivos si el envase está dañado.
- No se deben abrir los tubos de PCR tras la amplificación.
- No mezclar reactivos de diferentes lotes.
- El material usado debe eliminarse de conformidad con la legislación vigente en materia de protección del medio ambiente y gestión de residuos biológicos.
- Este kit contiene productos de origen animal. El conocimiento certificado del origen y/o del estado sanitario de los animales no garantiza por completo la ausencia de agentes patógenos transmisibles. Por lo tanto, se recomienda tratar estos productos como potencialmente infecciosos y manipularlos observando las precauciones de seguridad habituales (no ingerir ni inhalar).

F. Extracción de ácidos nucleicos

1. Preparación de heces o muestras ambientales

Los ácidos nucleicos se deben extraer de las muestras antes de utilizar el kit.

Utilización del dispositivo de preparación de heces ADIAPREP (ref. ADPREP-200)

- Recoger 1 cuchara de materia fecal utilizando el dispositivo ADIAPREP.
- Aplastar la cuchara y volver a introducirla en el aparato.
- Vortex hasta obtener una suspensión homogénea.
- Transferir 1 mL a un microtubo, una tira, o una placa de 96 pocillos.
- Centrifugar durante 5 minutos a 3 000 g y desechar el sobrenadante.
- Añadir al precipitado 300 mg de esferas de trituración y 500 µL de agua desmineralizada estéril (o tampón de lisis LF1 del kit ADIAPURE Lysis Flex).
- Triturar durante 5 minutos a 30 Hz en Mixer Mill o 3 x 45 segundos en Fast Prep/Ribolyser y luego centrifugar 5 minutos a 3 000 g.
- Extraer un volumen de sobrenadante utilizando un kit de extracción recomendado.

2. Kits de extracción

Los kits de extracción de ADN/ARN enumerado a continuación son recomendados y suministrados por Bio-X Diagnostics:

Nombre del producto	Tipo de extracción	Número de tests y referencia
ADIAMAG™	Esferas magnéticas	200 tests: ref. NADI003 800 tests: ref. NADI003-XL
ADIAPURE™ Lysis Flex	Lisis directa	500 mL: ref. ADPLF1-500
ADIAPURE™ PARATB MILK	Captura en esferas magnéticas de la leche	100 tests: ref. ADIADP04M1-100

Para la preparación de las heces y extracción, consulte la versión de las instrucciones disponible en el sitio web, indicada en el certificado de análisis incluido en el kit PCR utilizado.

Los protocolos de extracción validados se describen en el archivo de validación del kit. Pueden utilizarse otros kits de extracción previa validación por parte del usuario.

Tras la extracción, los ácidos nucleicos extraídos pueden almacenarse a +2/8 °C durante unas horas antes de su uso. Para un almacenamiento más prolongado, deben conservarse a una temperatura inferior a -15 °C o -65 °C.

3. Controles

La utilización de controles permite controlar la fiabilidad de los resultados. Los controles se incluyen por serie de análisis según las recomendaciones definidas por las normas (Cf. AFNOR U47-600...).

Controles	Validación de	Procedimiento
Control reactivo (NTC)	Ausencia de contaminación por amplificación	5 µL de NF-Water en un pocillo por serie de PCR
PARATB CTL+ (Dilución pura al 1/10 000)	Amplificación de la diana y rango estándar	5 µL CTL+ para cada punto del rango en un pocillo por serie de PCR
Control negativo de extracción	Ausencia de contaminación para la extracción y la amplificación	1 extracción (agua o tampón de lisis) por serie de extracción
Control positivo de extracción	Fases de extracción y amplificación	1 extracción (muestra positiva entre 1 y 100X LD _{Méthode}) por serie de extracción
Control positivo cuantificado de heces para la PCR relativa	Fases de extracción y amplificación	1 extracción (muestra positiva cuantificada) por serie de extracción

G. Procedimiento

1. Preparación de la solución de amplificación A6

- Añadir **1000 µL** de «**Rehydration buffer**» por tubo de A6.
- Homogeneizar el tubo mediante un agitador de tipo vórtex > 20 segundos.
- Tras la reconstitución, dividir en alícuotas y conservar la solución a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit. No descongelar más de 3 veces.
- Para información sobre la utilización, consultar el apartado «Amplificación», Fase 1.

2. Preparación de los controles

a. Uso del EPC-Ext

Se debe añadir el EPC-Ext a cada de las muestras y a los controles.

- Añadir **1000 µL** de «**NF-Water**» por tubo.
- Homogeneizar el tubo mediante un agitador de tipo vórtex > 20 segundos.
- Tras la reconstitución, dividir en alícuotas y conservar la solución a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit. No descongelar más de 3 veces.
- Para la utilización, 2 soluciones posibles:
 - Bien añadir 5 µL de EPC-Ext en el primer tampón de lisis durante la extracción.

- bien añadir 0,5 µL de EPC-Ext en cada pocillo de la PCR (si utilización del extracción ADIAPURE™ PARATB MILK). Véase § «Amplificación», Fase 1.

b. Preparación del control CTL+

- Añadir **200 µL** de «**NF- Water**» por tubo.
- Homogeneizar el tubo con un agitador tipo vórtex > 20 segundos, hasta la disolución completa del residuo azul.
- Tras la reconstitución, dividir en alícuotas la solución y conservarla a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit. No descongelar más de 3 veces.
- En el caso de una prueba cuantitativa, realizar un rango estándar extemporaneo en agua libre de Nucléase (mínimo de 4 puntos de rango, incluyendo 1 en la LQ_{PCR}).

Dilución	Concentración PARATB CTL+ (copia IS900/PCR)
Puro	10⁶
1/10	10⁵
1/100	10⁴
1/1000	10³
1/10 000	10²
1/100 000	10 (=LD-LC_{PCR})

Utilice **5 µL** de cada dilución en los pocillos correspondientes (véase § «Amplificación», Fase 2).

En el caso de una prueba cualitativa o relativa, utilice **5 µL** de la dilución **1/1000** en uno de los pocillos específicos (véase § «Amplificación», Fase 2).

3. Amplificación

Advertencia:

- Antes de empezar, descongelar los reactivos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- Homogeneizar todos los reactivos y muestras antes de su uso.
- Conservar los reactivos a una temperatura inferior a -15 °C después de su uso.

Fase 1:

Si se ha utilizado EPC-Ext durante la extracción:

Dispensar **10 µL** de reactivo de amplificación A6 en cada pocillo PCR.

Si no se ha utilizado EPC-Ext durante la extracción:

Colocar (n+1) x **10 µL** de reactivo de amplificación A6 en un microtubo y añadir (n+1) x **0,5 µL de EPC-Ext**. Dispensar **10 µL** de la mezcla en cada pocillo PCR.

Fase 2: Dispensar **5 µL** de extractos de ácidos nucleicos y **5 µL** de controles en cada pocillo específico.

Utilizar 5 µL de NF-Water para el control reactivo.

Fase 3: Cubrir los pocillos con una película óptica adecuada o con tapones.

Fase 4: Iniciar el análisis PCR.

El siguiente programa está diseñado para recicladores térmicos ABI Prism (como 7500, QuantStudio5, Step-one...) de Applied Biosystems, para Mx3000, Mx3005P y AriaMx de Agilent, para LightCycler de Roche Diagnostics, para Rotor-Gene Q de Qiagen, para CFX96 y Chromo 4 de Biorad y para MIC de BioMolecular System.

Programa ADN/ARN	
10 min. 45 °C	
2 min. 95 °C	
5 seg. 95 °C	40 ciclos
30 seg. 60 °C*	

*Lectura y parámetros para la adquisición de fluorescencia:

Fluorocromo	Absorbancia (nm)	Emisión (nm)
FAM	494	520
HEX o équivalent	530	549
ROX	575	602

Nota: El Quencher no es fluorescente. La mezcla contiene una lectura de referencia pasiva en los mismos espectros que ROX para las máquinas ABI.

Para otros reciladores térmicos, póngase en contacto con su representante comercial o con el departamento de atención al cliente (support.pcr@biox.com).

H. Interpretación de los resultados

1. Validación e interpretación de los resultados cualitativos

Visualizar todas las curvas y posicionar la línea de umbral para cada fluorocromo.

a. Validación de pruebas

La amplificación es válida si se obtienen los siguientes resultados.

Los valores Ct (Ciclo Umbral) esperados para el CTL+ se indican en el certificado de análisis del kit.

Controles	Amplificación		Validación de
	FAM	HEX o equivalente	
Control reactivo (NTC)	No	No/Si*	Ausencia de contaminación por amplificación
PARATB CTL+	Si	No/Si*	Amplificación de la diana
Control negativo de extracción	No	Si	Ausencia de contaminación por extracción
Control positivo de extracción	Si	Si	Pasos de extracción y amplificación

*Según se añade el EPC-Ext en la fase de amplificación.

b. Interpretación de los resultados

La extracción de ácidos nucleicos y la amplificación son **válidas** para cada muestra si se observa al menos una curva de amplificación típica en FAM o HEX (o equivalente).

Amplificación		Interpretación
FAM	HEX o equivalente	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
No	Si	No detectado
Si	Si/No	Detectado
No	No	Indeterminado

«Indeterminado»: sin curva de amplificación característica.

Posibles causas:

PCR defectuosa debido a inhibidores, error de configuración, ausencia de muestras, muestras degradadas y/o problema con la extracción de ácidos nucleicos (pérdida o destrucción de ácidos nucleicos).

Recomendaciones:

Configurar un nuevo ensayo PCR utilizando extractos de ácidos nucleicos puros y diluciones 10x en agua sin nucleasas.

Si el ensayo no es concluyente, se debe realizar una nueva extracción de ácidos nucleicos.

2. Validación e interpretación de los resultados cuantitativos

a. Rango de calibración

Dilución PARATB CTL+	Concentración (copies IS900/PCR)	Amplificación diana	Validación de
Pure	10 ⁶	Sí	Amplificación de la diana PARATB y de la curva de calibración
1/10	10 ⁵	Sí	
1/100	10 ⁴	Sí	
1/1000	10 ³	Sí	
1/10 000	10 ²	Sí	
1/100 000	10	Sí	

Para interpretar los resultados cuantitativos, hay que establecer una curva de calibración (número de ciclos = f (concentración logarítmica), determinar la ecuación de la curva ($y = ax + b$) y comprobar la eficacia de la PCR ($Eff\% = \left(10^{\frac{y-b}{a}} - 1\right) \times 100$).

La curva de calibración es válida si:

- Los 5 puntos del rango se amplifican. Sin embargo, puede omitirse un punto del rango si no es uno de los puntos extremos.
- El coeficiente de correlación R^2 es superior a 0,9.
- Eficiencia entre el 75 y el 125 %.

b. Interpretación de la cuantificación

La cuantificación de una muestra positiva sólo es posible en el dominio de cuantificación del uso del método (véanse los datos de validación).

Amplificación FAM	Estatus de la muestra
Sin señal	No detectado Ácido nucleico no detectado
Señal <LC _{MÉTODO}	Detectado Ácido nucleico detectado con una cantidad inferior al LC _{MÉTODO}
LC _{MÉTODO} < señal < LC _{máx}	Detectado Ácido nucleico cuantificable
Señal > LC _{máx}	Detectado Ácido nucleico detectado con una cantidad superior al LC _{máx}

En el caso de una muestra "cuantificable", la concentración se determina utilizando la ecuación de la curva de calibración:

$$x = 10^{\left(\frac{y-b}{a}\right)} \times F$$

Dónde: x : concentración (en EG/g de materia fecal si se utiliza F)

y : Valor Ct en FAM para la muestra positiva a cuantificar

b : intercepción

a : pendiente

F : coeficiente multiplicador

Para determinar un número equivalente de genoma/gramo de heces, es necesario utilizar un factor multiplicador (F) según el protocolo de extracción utilizado a continuación:

Protocolo ADIAMAG (con ADIAPREP)	F=6,4
Protocolo ADIAPURE Lysis Flex (con ADIAPREP)	F=9,4

Bio-X Diagnostics ofrece, previa solicitud (support.pcr@biox.com), un archivo Excel para el análisis cuantitativo.

Referencias

- Collins, J. D. *et al.*, Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces, *Vet. Microbiol.* (1993).
- Beinhauerova, M., *et al.* Development of a reference standard for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative PCR. *Sci Rep* (2021).
- Kralik P., *et al.* ; Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in a Limousin cattle herd. *Vet J* (2014).
- U47-600: Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne).

Símbolos	Significado
	Referencia del catálogo
	Fabricante
	Límite de temperatura
	Utilizar hasta
	Código del lote
	Consultar las instrucciones de uso
	Contenido suficiente para "n" tests
	Para uso veterinario <i>in vitro</i> únicamente - Para uso animal únicamente

- 1 | Extraer los ácidos nucleicos con

**Adia^X
Mag**



Escanearme para
descubrir Adiamag™

- 2 | Añadir **1000 µL** de **Rehydration buffer**
al solución de amplificación **A6**

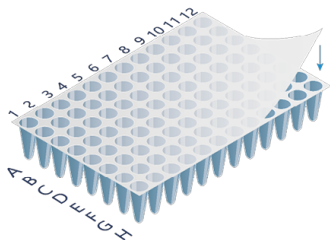


Si utiliza el EPC en la fase de extracción:

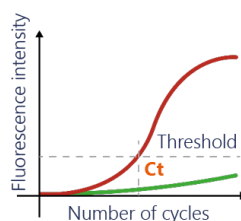
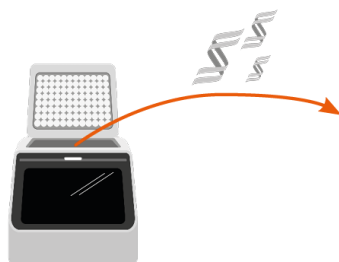
- 3 | Agregar **10 µL** de solución de
amplificación **A6**

- 4 | Distribuir **5 µL** de **ácidos nucleicos**,
CTL+ y **NF-Water**

- 5 | Sellar los pozos

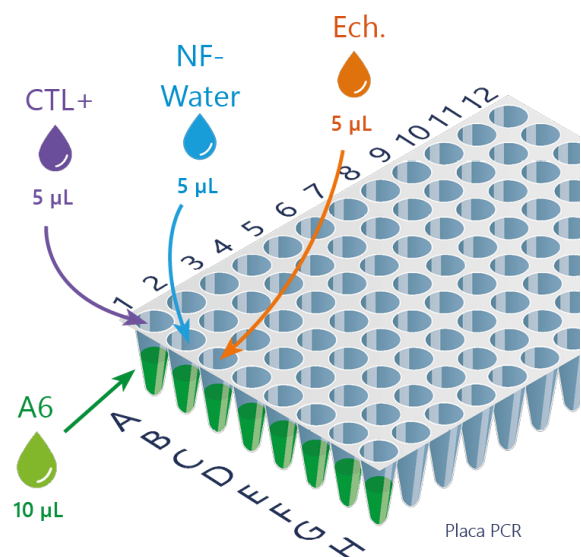


- 6 | Iniciar el análisis PCR



Si no se utiliza el EPC en la fase de extracción:

- 3 | Preparar una premezcla de **10 µL**
de solución de amplificación **A6** + **0,5 µL**
de **EPC**
Añadir **10 µL** de la premezcla



*Las notas no sustituyen a las instrucciones de uso de
las que son una síntesis.