



Adia^X Control

Control positivo de extracción cuantificada Paratb Heces

Referencia: ADC04SQ01

Heces positivas cuantificadas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Para uso veterinario *in vitro* únicamente



Composición del kit

Contenido		ADC04SQ01
EPCQ Paratb Faeces	Heces positivas cuantificadas de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	1 vial liofilizado (Para reconstituir)
NF-Water	Agua sin nucleasas	1 tubo de 2000 µL con tapón blanco (listo para usar)

Kit(s) de PCR relacionado(s)

Kit(s) de PCR relacionado(s)	Referencia(s)
ADIAVET™ PARATB REAL TIME	ADI045-100
ADIALYO™ PARATB	ADL04Y1-100

Historial de revisiones

Fecha	Versión	Modificaciones
02/2023	V01	Primera versión
11/2023	V02	Cambiar la cantidad de EPCQ de 50µl a 200µl.
09/2024	V03	Adición del kit asociado ADIALYO™ PARATB.

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

A. Introducción

La *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, o bacilo de Johne, coloniza la región yeyuno-ileal. El nivel de contaminación de la materia fecal varía según la fase de la enfermedad, desde unas pocas bacterias por gramo de heces al comienzo de la expresión crónica, hasta entre 10^4 y 10^{10} en la fase clínica (Collins *et al.*, 1993). Esta bacteria puede diseminarse entonces en el cuerpo del animal a través de los macrófagos; por lo que es posible la contaminación por el calostro, la leche y el esperma.

La cuantificación del nivel de contaminación es de interés para clasificar a los animales y aislar así a los más excretores. El kit de PCR ADIAVET PARATB REAL TIME permite la detección y cuantificación de micobacterias en heces mediante PCR relativa con EPCQ Paratb Faeces cuantificado a 10 000 equivalentes genómicos (GE)/g de heces (Kralik *et al.*, 2014; Navarro González *et al.*, 2019).

B. Principio de la prueba

El control de EPCQ Paratb Faeces se cuantifica a 10 000 EG/g de heces tras la resuspensión.

El control positivo se incluye en cada serie de extracción y permite semicuantificar la diana *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en muestras de heces, con los kits de PCR correspondientes.

Se validan dos métodos de extracción en PCR relativa utilizando EPCQ Paratb Faeces: ADIAMAG™ con ADIAFILTER™ y ADIAMAG™ con ADIAPREP™. (véanse los datos de validación del kit de PCR).

C. Condiciones de conservación

Antes de la reconstitución, conservar el EPCQ Paratb Faeces, a una temperatura inferior a +2/8 °C.

Tras la reconstitución, preparar alícuotas y conservarlas a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit.

D. Material necesario pero no suministrado

- Termociclador y dispositivo en tiempo real.
- Homogeneizador 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.
- Heces negativas a Paratb.
- Kit para la extracción de ácidos nucleicos ADIAMAG (Bio-X Diagnostics ref.: 200 tests: NADI003; 800 tests: NADI003-XL).
- Sistema de preparación fecal:
 - ADIAPREP™ (Bio-X Diagnostics ref.: 200 tests, ADPREP-200).
 - ADIAFILTER™ (Bio-X Diagnostics ref.: 100 tests ADIFIL100).
- Esferas de trituración:
 - Para el molino mezclador tipo Mixer Mill o similar:
 - ADIAPURE™ ALIQUOTED GLASS BEADS (Bio-X Diagnostics ref.: 200 tests, ADIADPBIA-480).
 - ADIAPURE™ GLASS BEADS RACKS 4x96 (Bio-X Diagnostics ref.: 384 tests, ADPBIAR-4x96).
 - Para el molino mezclador Ribolyser o similar:
 - Lysing Matrix B (MP biomedical, 100 tubes, ref. 116911100).
- Kit PCR relacionado.

E. Advertencias y precauciones

- Para uso veterinario *in vitro* únicamente.
- Para uso animal únicamente.
- Para uso profesional únicamente.
- 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. Reconstitución y uso de EPCQ Paratb Faeces

- Añadir **2 ml** de «**NF-Water**» por vial.
- Homogeneizar los tubos utilizando un mezclador, como el vórtex, > 20 segundos y hasta la disolución del triturado.
- Tras la reconstitución, dividir en alícuotas y almacenar la solución a una temperatura inferior a -15 °C. No descongelar más de 3 veces.

Este control debe integrarse en cada serie de extracción de análisis durante la PCR relativa.

Se recomienda realizar al menos un control de extracción negativo por sesión para verificar la ausencia de contaminación.

1. Extracción con ADIAPREP (ref. ADPREP-200)

- Recoger 1 cucharada de heces negativas y transferir a ADIAPREP.
- Añadir **200 µl de EPCQ Paratb Faeces**.
- Mezclar en vórtex hasta obtener una suspensión homogénea.
- Transferir 1 ml a un microtubo o bandeja, centrifugar durante 5 minutos a 3000 g y desechar el sobrenadante.
- Añadir 300 mg de esferas de trituración y 500 µl de agua desmineralizada estéril al triturado.
- Triturar durante 5 minutos a 30 Hz en el Mixer Mill o 3 x 45 segundos en el Fast Prep/Ribolyser y centrifugar durante 5 minutos a 3000 g.
- Extraer 100 µl de sobrenadante mediante el kit de extracción ADIAMAG (consultar la versión de las instrucciones disponible en el sitio web, indicada en el certificado de análisis incluido en el kit de extracción utilizado).

2. Extracción con ADIAFILTER (ref. ADIFIL100)

- Recoger 3 g (+/- 0,2) de heces en 20 ml de agua desmineralizada estéril (o la misma relación peso/volumen).
- Añadir **200 µl de EPCQ Paratb Faeces**.
- Mezclar en vórtex hasta obtener una suspensión homogénea.
- Dejar reposar durante 10-20 minutos hasta la sedimentación.
- Colocar 10 ml de sobrenadante en el ADIAFILTER centrifugar durante 5 minutos a 3000 g y desechar el sobrenadante y el ADIAFILTER.
- Añadir 500 µl de agua desmineralizada estéril al triturado, agitar y transferir a un microtubo que contenga 300 mg de esferas de trituración.
- Triturar durante 10 minutos 30 Hz en Mixer Mill o 3 x 45 segundos en Fast Prep/Ribolyser y centrifugar durante 5 minutos 15 000 g.
- Extraer 100 µl de sobrenadante mediante el kit de extracción ADIAMAG (consultar la versión de las instrucciones disponible en el sitio web, indicada en el certificado de análisis incluido en el kit de extracción utilizado).

3. Amplificación

Los ácidos nucleicos extraídos se amplifican con el kit PCR asociado de Bio-X Diagnostics según sus instrucciones de uso.

G. Lectura e interpretación

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

1. Validación del test

La amplificación es válida si se obtienen los siguientes resultados. Los valores indicativos de Ct (Ciclo Umbral) esperados para EPCQ Paratb Faeces se indican en el certificado de análisis (los límites de aceptación son 3 Ct).

Los valores Ct (Ciclo Umbral) indicativos esperados para CTL+ figuran en el certificado de análisis del kit PCR asociado.

Control	Amplificación		Validación de
	FAM	HEX o equivalente	
EPCQ Paratb Faeces	Sí	Sí	Proceso de extracción y amplificación
Control negativo (CN)	No	No	Ausencia de contaminación por amplificación
PARATB CTL+	Sí	No	Amplificación de la diana y del control interno
Control de extracción negativo	No	Sí	Ausencia de contaminación por extracción

2. Interpretación de los resultados relativos de la PCR

La extracción y amplificación del ácido nucleico son válidas para cada muestra si se observa al menos una curva de amplificación característica en FAM y HEX o equivalente.

Amplificación		Interpretación
FAM	HEX o equivalente	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>
No	Sí	No detectado
Sí $Ct_{\text{muestra}} < Ct_{\text{EPCQ-1Ct}}$	Sí/No	Detectado en mayor cantidad que el EPCQ Paratb Faeces
$Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{EPCQ} \pm 1Ct}$	Sí/No	Detectado en cantidades próximas al EPCQ Paratb Faeces
$Ct_{\text{muestra}} > Ct_{\text{EPCQ} + 1Ct}$	Sí/No	Detectado en cantidades inferiores al EPCQ Paratb Faeces
No	No	No detectado

"No determinado": ausencia de curva de amplificación característica.

Posibles causas:

PCR defectuosa (presencia de inhibidores, error de programa, ausencia de muestra o muestra demasiado degradada) y/o Deficiencia en la extracción de ácidos nucleicos (pérdida o destrucción de ácidos nucleicos).

Acciones recomendadas: Volver a hacer la PCR con el extracto de los ácidos nucleicos puro y diluido a 1/10 en agua sin nucleasas; volver a hacer la extracción de ácidos nucleicos si el test sigue sin ser válido o solicitar otra muestra.

Referencias

- Collins J. D. *et al.* (1993), Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. Vet. Microbiol. 36: 289-299.
- Kralik P., *et al.* (2014), Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* in a Limousin cattle herd. Vet J Jul ;201(1):91-4.
- Navarro-Gonzalez N. *et al.* (2019), Longitudinal study of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* faecal shedding patterns and concurrent serological patterns in naturally infected dairy cattle. J Dairy Sci Oct;102(10):9117-9137.

Símbolos

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