



Adia^X Vet

Manual de instrucciones
AD1045-PTUB_NO_(ES)_V01
06/2023

PARATB REAL TIME

Referencia: AD1045-100

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	✓	5
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 AD1045-100
		100 Reacciones
A5	Solución de amplificación	2 tubos con tapón verde de 1000 µl (listos para usar)
PARATB CTL+	Control positivo PARATB	1 tubo con tapón morado (para reconstituir)
EPC-Ext	Control exógeno de extracción	2 tubos de 300 µl con tapón verde (listos para usar)
EPC-Amp	Control exógeno de la amplificación	1 tubo de 100 µl con tapón incoloro (listos para usar)
NF-Water	Agua sin nucleasas	1 tubo de 1000 µl con tapón blanco (listo para usar)

Historial de revisiones

Fecha	Versión	Modificaciones
01/2020	NE045-10	Versión anterior
06/2023	AD1045-PTUB_NO_(ES)_V01	Nuevo formato Adición de un sistema de prefiltración con ADIAPREP Cuantificación mediante PARATB CTL+ Disponibilidad de kits complementarios

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

Smart solutions for sharp decisions

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.

Bio-X Diagnostics ofrece 3 tipos de análisis:

- PCR cualitativa.
- PCR cuantitativa. El Paratb CTL+ se utiliza para producir una curva estándar (equivalente genoma/gramo de heces).

B. Principio de la prueba

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

- *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (sonda marcada con FAM).
- Control exógeno (sonda marcada en HEX o equivalente), que se puede utilizar:
 - Control de extracción y amplificación si el EPC-Ext se añade a cada muestra durante la extracción de ácidos nucleicos (puede utilizarse con el kit de extracción ADIAMAG o con columnas de sílice).
 - Control de amplificación si el EPC-Amp se añade a la solución A5 (en el caso de que las muestras se hayan extraído de la leche con el kit ADIAPURE PARATB MILK).

El control positivo PARATB CTL+, incluido en el kit, permite la cuantificación de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

C. Condiciones de conservación

Tras su recepción, el kit debe conservarse a -15°C hasta la fecha de caducidad.

Se recomienda hacer alícuotas de la solución A5 si debe descongelarse más de 3 veces.

No descongelar más de 3 veces.

Conservar protegido de la luz.

No mezclar reactivos de dos lotes diferentes.



D. Material necesario pero no suministrado

- Reciclador térmico y dispositivo 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 preparación fecal:
 - ADIAPREP™ (Bio-X Diagnostics, ref. ADPREP-200 (200 tests)).
 - ADIAFILTER™ (Bio-X Diagnostics, ref. ADIFIL100 (100 tests)).
- Esferas de trituración.
Para molino mezclador de tipo Mixer Mill:

- ADIAPURE™ ALIQUOTED GLASS BEADS (Bio-X Diagnostics, ref. ADIADPBIA-480 (480 tests)).
- ADIAPURE™ GLASS BEADS RACKS 4x96 (Bio-X Diagnostics, ref. ADPBIA-4x96).

Para Fast Prep o Ribolyser:

- Lysing Matrix B (MP biomedical, 100 tubes, ref. 116911100).
- Kit de extracción de ácidos nucleicos.



Kits complementarios para adopción de métodos y PCR

- **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}).
- **LD_{PCR} Positive Control- PARATB (Ref.: ADC04LD)** Confirmación de rendimientos - LD_{PCR} del kit.
- **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).

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. Preparación de heces o muestras ambientales

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

1. Con ADIAPREP (ref. ADPREP-200)

- Recoger 1 cucharada de materia fecal y transferirla al ADIAPREP.
- Agitar hasta obtener una suspensión homogénea.
- Transferir 1 ml a un tubo limpio, centrifugar 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.
- Utilice un volumen de sobrenadante acorde con el kit de extracción elegido.

2. Con ADIAFILTER (ref. ADIFIL100)

- Recoger 3 g (+/- 0,2) de materia fecal, introducir en vórtex en 20 ml de agua desionizada estéril (o idéntica relación peso/volumen) y dejar reposar de 10 a 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 a 30 Hz en Mixer Mill o 3 x 45 segundos en Fast Prep/Ribolyser y centrifugar durante 5 minutos a 15 000 g.
- Utilice un volumen de sobrenadante acorde con el kit de extracción elegido.

3. Sin sistema ADIAFILTER

- Recoger 3 g (+/- 0,2) de materia fecal (o idéntica relación peso/volumen), introducir en vórtex en 20 ml de agua desmineralizada estéril y dejar reposar de 10 a 20 minutos hasta la sedimentación.
- Transferir 1 ml a un microtubo que contenga 300 mg de esferas de trituración.
- Triturar durante 10 minutos a 30 Hz en Mixer Mill o 3 x 45 segundos en Fast Prep/Ribolyser y centrifugar durante 5 minutos a 15 000 g.
- Utilice un volumen de sobrenadante acorde con el kit de extracción elegido.

G. Procedimiento

1. Uso de EPC-Ext

EPC-Ext debe añadirse a cada muestra y a los controles de extracción (excepto con el kit ADIAPURE™ PARATB MILK).

Dividir en alícuotas y almacenar la solución a una temperatura inferior a -15 °C según el tamaño de la serie de extracción. No descongelar más de 3 veces.

Añadir **5 µl** de EPC-Ext en el primer tampón de lisis de extracción de ácidos nucleicos.

2. Kits de extracción

Los ácidos nucleicos se deben extraer de las muestras antes de utilizar el kit. Bio-X Diagnostics recomienda los kits de purificación de ADN/ARN que se detallan a continuación.

Nombre del producto	Tipo de extracción	Número de tests y referencia
ADIAMAG™	Esferas magnéticas	200 tests: ref. NADI003 800 tests: ref. NADI003-XL
ADIAPURE™ PARATB MILK	Captura en perlas magnéticas de la leche	100 tests: ref. ADIADP04M1-100

El manual de instrucciones para la extracción está disponible en el sitio web, toda la información se indica en el certificado de análisis incluido en el kit PCR.

Se pueden utilizar otros kits de purificación si han sido validados por el usuario.

Tras la extracción, los ácidos nucleicos se pueden conservar en hielo o a +2/8 °C hasta su uso. Para prolongar la conservación, se deberán conservar a una temperatura inferior a -15 °C o -65 °C.

3. Controles

Los controles permiten verificar la fiabilidad de los resultados. Se pueden incluir controles por series de análisis según las recomendaciones definidas por las normas.

Controles	Validación de	Cómo proceder
Control negativo (CN)	Ausencia de contaminación por amplificación	5 µl de NF-Water en un pocillo por serie
PARATB CTL+ (Dilución pura al 1/100 000)	Amplificación de la diana y rango estándar	5 µl CTL+ para cada punto del rango en un pocillo por serie
Control de extracción negativo	Ausencia de contaminación para la extracción y la amplificación	1 extracción (agua o tampón de lisis) por serie
Control de extracción positivo	Extracción y amplificación	1 extracción (muestra positiva entre 1 y 100 x LD _{Método}) por serie
Control positivo cuantificado de heces para la PCR relativa	Extracción y amplificación	1 extracción (muestra positiva cuantificada) por extracción

4. Uso de EPC-Amp

El EPC-Amp se utiliza cuando no se ha añadido el EPC-Ext durante la extracción de ácidos nucleicos (ejemplo: utilizando el kit ADIAPURE™ PARATB MILK).

Dividir en alícuotas y almacenar la solución a una temperatura inferior a -15 °C según el tamaño de la serie de extracción. No descongelar más de 3 veces.

Para cada pocillo de PCR, añada **1 µl** de EPC-Amp a la solución de amplificación. (véase § «AMPLIFICACIÓN», Fase 1).



5. Uso de CTL+

Añadir **200 µl** de «NF-Water» por tubo.

Homogeneizar los tubos con un mezclador, como el vórtex, > 20 segundos y hasta la disolución del triturado azul.

Tras la reconstitución, dividir en alícuotas y conservarlas a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit. No descongelar más de 3 veces.

Para la cuantificación, preparar los siguientes rangos en agua sin nucleasas (mínimo 4 puntos de rango, incluido 1 en LQ_{PCR}).

Dilución	Concentración PARATB CTL+ (copias/PCR)
Puro	10 ⁶
1/10	10 ⁵
1/100	10 ⁴
1/1000	10 ³
1/10 000	10 ²
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).

6. 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 **20 µl** de solución de amplificación (A5) en cada pocillo.

Si no se ha utilizado EPC-Ext durante la extracción

Colocar (n*+1) x **20 µl** de solución de amplificación (A5) en un microtubo y añadir (n*+1) x **1 µl** de EPC-Amp. Dispensar **20 µl** de la mezcla en cada pocillo.

*n = número de pocillos PCR a analizar.

Fase 2: Dispensar **5 µl** de extractos de ácidos nucleicos y **5 µl** de controles en cada pocillo específico. Utilizar NF-Water para el control negativo (CN).

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 reciladores 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 estándar de ADN		
2 min. 50 °C		
10 min. 95 °C		
15 seg. 95 °C*	45 ciclos	
60 seg. 60 °C**		

*30 seg. 95 °C para MX3000 y MX3005P

** Lectura y parámetros para la adquisición de fluorescencia:

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

Nota: El Quencher no es fluorescente. La solución A5 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 negativo (CN)	No	Sí/No*	Ausencia de contaminación por amplificación
PARATB CTL+	Sí	Sí/No*	Amplificación de la diana
Control negativo de extracción	No	Sí	Ausencia de contaminación por extracción
Control positivo de extracción	Sí	Sí	Pasos de extracción y amplificación
Control positivo de heces cuantificado	Sí	Sí	Pasos de extracción y amplificación

*Según se añade EPC-Amp o no.

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	Diana <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
No	Sí	No detectado
Sí	Sí/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 CTL+

Dilución PARATB CTL+	Concentración (Copias IS900/PCR)	Amplificación FAM	Validación de
Puro	10 ⁶	Sí	Amplificación de la diana PARATB y preparación 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 ($Eff\% = (10^{\frac{1}{a}} - 1) \times 100$).

La curva de calibración es válida si:

- Los 6 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 (opcional)

El coeficiente multiplicador se determina en función de la matriz de la muestra y del método de extracción. Ejemplos de coeficientes multiplicadores con el kit de extracción ADIAMAG según el manual del usuario NEKF:

Protocolo ADIAMAG con ADIAFILTER	$F=2,7$
Protocolo ADIAMAG con ADIAPREP	$F=5,35$

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).

Símbolos

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
	Conservar protegido de la luz

- 1 | Extraer los ácidos nucleicos con

**Adia^X
Mag**



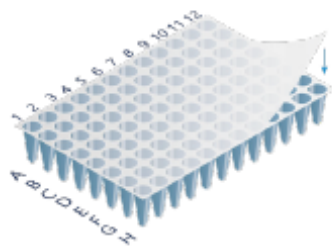
Escanearme para descubrir Adiamag™

Si utiliza el EPC-Ext:

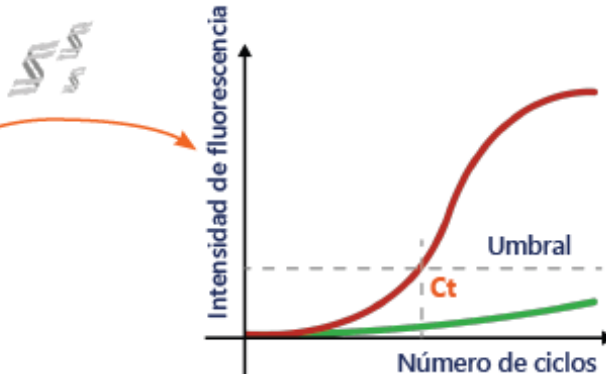
- 2 | Agregar **20 µL** de solución de amplificación **A5**

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

- 4 | Sellar los pozos



- 5 | Iniciar el análisis PCR



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

Si no se utiliza el EPC-Ext:

- 2 | Preparar una premezcla de **20 µL** de solución de amplificación **A5** + **1 µL** de EPC-Amp
Añadir **20 µL** de la premezcla

