

# Manual del cattletype<sup>®</sup> MAP Ab

Para la detección de anticuerpos de  
*Mycobacterium avium* subsp.  
*paratuberculosis*

---

Certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal, n.º MA: FLI-B 471

**REF** 5 placas (n.º de catálogo CT270803)

**REF** 20 placas (n.º de catálogo CT270805)\*



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,  
04103 Leipzig, Alemania

\* disponible únicamente a petición

# Contenido

Contenido del kit .....	3
Uso previsto .....	4
Símbolos .....	4
Control de calidad .....	5
Almacenamiento .....	5
Información de seguridad .....	5
Introducción .....	6
Principio .....	6
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario .....	7
Notas importantes.....	8
Precauciones generales .....	8
Protocolo: procedimiento de prueba ELISA .....	9
Cuestiones importantes antes de comenzar .....	9
Antes de comenzar .....	9
Preparación de muestras de leche .....	10
Procedimiento de prueba para muestras de suero y plasma .....	11
Procedimiento de prueba para muestras de leche .....	13
Interpretación de los datos .....	15
Criterios de validación .....	15
Cálculo .....	15
Interpretación de los resultados .....	16
Interpretación de los datos para las muestras de suero y plasma ...	16
Interpretación de los datos para las muestras de leche (protocolo corto) .....	16
Interpretación de los datos para las muestras de leche (protocolo durante toda la noche) .....	17
Índice de cambios .....	19
Guía rápida para cattletype MAP Ab .....	20

## Contenido del kit

<b>cattletype MAP Ab</b>	<b>(5)</b>	<b>(20)</b>
<b>N.º de catálogo</b>	<b>CT270803</b>	<b>CT270805*</b>
<b>Número de placas</b>	<b>5</b>	<b>20</b>
Test Plate (placa de prueba): placa de microvaloración con 96 pocillos, recubierta de antígeno MAP no infeccioso	5	20
Sample Diluent (diluyente de muestras), listo para utilizar	1 x 100 ml	1 x 400 ml
Negative Control (control negativo), listo para utilizar	1 x 3,5 ml	2 x 3,5 ml
Positive Control (control positivo), listo para utilizar	1 x 3,5 ml	2 x 3,5 ml
Wash Buffer (tampón de lavado), concentrado 10x	3 x 125 ml	2 x 500 ml
Conjugate (conjugado), listo para utilizar	1 x 60 ml	1 x 240 ml
TMB Substrate (sustrato TMB), listo para utilizar	1 x 60 ml	1 x 240 ml
Stop Solution (solución de parada), lista para utilizar	1 x 60 ml	1 x 240 ml
Manual	1	1

\* disponible únicamente a petición

# Uso previsto

El cattletype MAP Ab es un ensayo ELISA indirecto que sirve para detectar anticuerpos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) en muestras de suero, plasma y leche procedentes de ganado vacuno, ovino y caprino.

Este kit está autorizado por el Friedrich-Loeffler-Institut y ha sido certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal (FLI-B 471) para su uso en Alemania en procedimientos de diagnóstico veterinario.

**Para uso exclusivo en el ámbito veterinario.**

## Símbolos



Fabricante legal



Número de lote



Fecha de caducidad



Límites de temperatura para almacenamiento



Manual



Número de catálogo



Número de material



Para muestras de ganado vacuno, ovino y caprino

## Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de INDICAL, cada lote del cattletype MAP Ab se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

## Almacenamiento

Los componentes del kit para ensayo ELISA cattletype MAP Ab deben almacenarse a una temperatura comprendida entre 2-8 °C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El Wash Buffer (10x) y la Stop Solution pueden almacenarse a temperatura ambiente (18-25 °C) para evitar la cristalización de sales. Si el kit se suministra con tiras reactivas, almacene las que sobren en la bolsa de aluminio con cierre junto con secante a una temperatura comprendida entre 2-8 °C hasta el próximo uso. Las tiras reactivas pueden almacenarse durante 6 semanas como mínimo después de abrir la bolsita de las placas.

## Información de seguridad

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes. Puede solicitarlas a su representante de ventas local o por correo electrónico a [compliance@indical.com](mailto:compliance@indical.com).



**PRECAUCIÓN: La Stop Solution contiene ácido sulfúrico de 0,5 M.**

Todos los residuos de muestras y los objetos que han estado en contacto con las mismas deben descontaminarse o eliminarse como material potencialmente infeccioso.

# Introducción

El cattletype MAP Ab es una solución de alta sensibilidad que sirve para detectar anticuerpos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP).

MAP es el agente causante de la paratuberculosis, también conocida como enfermedad de Johne. La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa, crónica e incurable que presenta un largo periodo de incubación y se caracteriza por una pérdida de peso excesiva y diarrea persistente en el ganado vacuno durante la fase final de la enfermedad. La bacteria MAP se propaga por todo el mundo entre los rumiantes. El kit cattletype MAP Ab permite la detección semicuantitativa de anticuerpos anti-MAP y se puede utilizar con muestras de suero, plasma y leche.

## Principio

Las muestras se diluyen e incuban previamente con un Sample Diluent que contiene extracto de *Mycobacterium phlei* inactivado para minimizar las reacciones cruzadas con microbacterias atípicas. La placa de microvaloración está recubierta de antígeno de MAP. Durante la incubación de la muestra, los anticuerpos específicos de MAP se unen al antígeno inmovilizado. El material sin unir se elimina mediante aclarado. El conjugado anti-IgG acoplado a peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase, HRP) detecta los anticuerpos unidos al antígeno. El conjugado sin unir se elimina mediante aclarado. Al añadir Substrate Solution se inicia una reacción colorimétrica que se detiene trascurridos 10 minutos. Si se detecta la presencia de anticuerpos específicos de MAP en la muestra, la HRP cataliza una reacción de color azul que se vuelve amarillo después de añadir la Stop Solution. La densidad óptica (DO) se mide mediante un espectrofotómetro. Los valores de DO se correlacionan con la concentración de anticuerpos anti-MAP de la muestra.

# Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Vasos de precipitados
- Cilindros de medición
- Pipetas (ajustables)
- Pipetas multicanal (ajustables)
- Aluminio o lámina adhesiva para cubrir la Test Plate
- Opcional: dispositivo para el suministro y la aspiración de Wash Buffer
- Lector de absorbancia de placa de microvaloración
- Tubos o placas para diluir las muestras
- Agua destilada

# Notas importantes

## Precauciones generales

El usuario debe proceder siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- No exponga la TMB Substrate Solution a luz intensa o a la luz solar durante la realización de la prueba.
- Evite que los componentes del kit para la prueba se contaminen o mezclen con los componentes de otros lotes.
- No utilice los componentes del kit para la prueba si están caducados.
- El agua procedente de sistemas de intercambio iónico utilizada para diluir el Wash Buffer (10x) puede interferir con el ensayo si no es lo suficientemente pura. Utilice agua doblemente destilada o agua de alta pureza (p. ej., Milli-Q®).
- A fin de obtener resultados exactos de la prueba, es imprescindible utilizar material de cristal limpio y pipetear y aclarar con atención, así como respetar de forma estricta los tiempos de incubación indicados durante la prueba.

# Protocolo: procedimiento de prueba ELISA

## Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea el apartado “Notas importantes”, en la página 8, antes de comenzar.

## Antes de comenzar

- Permita que los reactivos se equilibren a temperatura ambiente (18-25 °C) inmediatamente antes de utilizarlos. Si se han precipitado cristales de sal en el Wash Buffer (10×), disuélvalos agitando suavemente y aplicando calor.
- Diluya el Wash Buffer (10×) con agua destilada en una proporción de 1:10. Por ejemplo, para una sola Test Plate, diluya 25 ml de Wash Buffer (10×) en 225 ml de agua destilada y mezcle.
- Muestras de suero/plasma: antes de proceder a su análisis, diluya las muestras de suero/plasma con Sample Diluent en una proporción de 1:20 (p. ej., diluya 10 µl de muestra en 190 µl de Sample Diluent) y mezcle bien. Utilice tubos de plástico o placas de microvaloración sin recubrimiento para la dilución y la preincubación. Cambie las puntas de las pipetas para cada muestra.
- Los controles se suministran listos para utilizar y no requieren dilución para analizar suero/plasma.

**Nota: Al analizar muestras de leche en el protocolo durante toda la noche, se requiere la dilución de los controles directamente en la Test Plate.**

## Preparación de muestras de leche

Antes de proceder a su análisis, las muestras de leche se deben desgrasar. Centrifugue las muestras de leche entera durante 10 minutos a 3000 × g a una temperatura de 10 °C o almacene las muestras a 2-8 °C durante toda la noche. A continuación, retire la crema de la leche.

**Obtenga una muestra de leche de debajo de la nata. Si es necesario, utilice una punta distinta para el muestreo y para la introducción en la capa de nata. Evite que la nata se transfiera a los pocillos de la placa de microvaloración, ya que podrían producirse reacciones no específicas.**

Diluya la leche descremada con Sample Diluent en una proporción de 1:2 (p. ej., diluya 70 µl de muestra en 70 µl de Sample Diluent) y mezcle bien. Cambie las puntas de las pipetas para cada muestra.

# Procedimiento de prueba para muestras de suero y plasma

Lea el apartado “Antes de comenzar”, en la página 9.

## Procedimiento

1. Incube previamente las muestras diluidas durante 15 min-2 horas a temperatura ambiente (18-25 °C) o durante toda la noche (14-22 horas) a 2-8 °C.

Cierre los tubos de plástico y cubra la placa de preincubación (con una tapa o una lámina adhesiva).

2. Pipetee 100 µl del Negative Control (por duplicado) y del Positive Control (por duplicado) en los pocillos de la Test Plate.
3. Pipetee 100 µl de las muestras preincubadas en el resto de los pocillos y mezcle.

**Nota:** registre las posiciones de los controles y las muestras en un protocolo de prueba. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para la transferencia de muestras. Cubra la Test Plate.

4. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
5. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
6. Aclare cada pocillo 3 veces con 300 µl de Wash Buffer preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
7. Pipetee 100 µl de Conjugate listo para utilizar en cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
8. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.

9. Aclare cada pocillo 3 veces con 300  $\mu$ l de Wash Buffer preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
10. Pipetee 100  $\mu$ l de TMB Substrate Solution en cada pocillo.
11. Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Comience a medir el tiempo después de llenar el primer pocillo.
12. Detenga la reacción añadiendo 100  $\mu$ l de Stop Solution a cada pocillo. Añada la Stop Solution en el mismo orden en que se añadió la Substrate Solution.
13. Mida la DO en el lector de placas a 450 nm en un periodo de 20 minutos tras la parada de la reacción.

La medición a una longitud de onda de referencia (620-650 nm) es opcional.

## Procedimiento de prueba para muestras de leche

- Lea el apartado “Antes de comenzar”, en la página 9.
- Las muestras de leche se pueden analizar con el protocolo corto o durante toda la noche.  
**Protocolo corto:** Los controles están listos para su uso. Siga los pasos 2a y 4a.  
**Protocolo durante toda la noche:** Diluya los controles 1:2 y tenga en cuenta los pasos 2b y 4b.

### Procedimiento

1. Incube previamente las muestras diluidas durante 15 min-2 horas a temperatura ambiente (18-25 °C).  
Cierre los tubos de plástico y cubra la placa de preincubación (con una tapa o una lámina adhesiva).
2. Diluya los controles del kit de acuerdo con el protocolo de prueba elegido (corto o durante toda la noche):
  - 2a. **Protocolo corto:** Pipetee 100 µl del Negative Control (por duplicado) y del Positive Control (por duplicado) en los pocillos correspondientes de la Test Plate.
  - 2b. **Protocolo durante toda la noche:** Pipetee 50 µl de Sample Diluent en 4 pocillos de la Test Plate. Pipetee 50 µl de Negative Control y de Positive Control (por duplicado) en los pocillos correspondientes y mezcle bien.
3. Pipetee 100 µl de las muestras incubadas previamente en los pocillos de la Test Plate.  
**Nota:** registre las posiciones de los controles y las muestras en un protocolo de prueba. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para la transferencia de muestras. Cubra la Test Plate.
4. Incube las muestras de acuerdo con el protocolo de prueba elegido (corto o durante toda la noche):

- 4a. **Protocolo corto:** Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C)
- 4b. **Protocolo durante toda la noche:** Incube durante toda la noche (14-22 h) a 28 °C.
5. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
6. Aclare cada pocillo 3 veces con 300 µl de Wash Buffer preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
7. Pipetee 100 µl de Conjugate listo para utilizar en cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
8. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
9. Aclare cada pocillo 3 veces con 300 µl de Wash Buffer preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
10. Pipetee 100 µl de TMB Substrate Solution en cada pocillo.
11. Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Comience a medir el tiempo después de llenar el primer pocillo.
12. Detenga la reacción añadiendo 100 µl de Stop Solution a cada pocillo. Añada la Stop Solution en el mismo orden en que se añadió la Substrate Solution.
13. Mida la DO en el lector de placas a 450 nm en un periodo de 20 minutos tras la parada de la reacción.

La medición a una longitud de onda de referencia (620-650 nm) es opcional.

# Interpretación de los datos

## Criterios de validación

Los resultados serán válidos si se cumplen los criterios siguientes:

- El valor medio (VM) de la DO medida para el Positive Control (PC) debe ser  $\geq 0,6$ .
- El valor medio (VM) de la DO medida para el Negative Control (NC) debe ser  $\leq 0,25$ .

En el caso de obtener ensayos no válidos, repita la prueba después de leer detenidamente las instrucciones de uso.

## Cálculo

Calcule los valores medios (VM) de la DO medida para el Negative Control (NC) y el Positive Control (PC).

El cociente (M/P) de la DO de la muestra con respecto a la DO media del Positive Control se calcula de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$M/P = \frac{DO_{\text{muestra}} - VM DO_{\text{NC}}}{VM DO_{\text{PC}} - VM DO_{\text{NC}}}$$

# Interpretación de los resultados

## Interpretación de los datos para las muestras de suero y plasma

- **Las muestras con un cociente M/P  $<0,3$  se consideran negativas.**  
No se han podido detectar anticuerpos específicos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
- **Las muestras con un cociente M/P  $\geq 0,3$  y  $<0,4$  se consideran sospechosas.**  
Deben volver a analizarse las muestras con resultados sospechosos.
- **Las muestras con un cociente M/P  $\geq 0,4$  se consideran positivas.**  
Se han detectado anticuerpos específicos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

## Interpretación de los datos para las muestras de leche (protocolo corto)

- **Las muestras con un cociente M/P  $<0,2$  se consideran negativas.**  
No se han podido detectar anticuerpos específicos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
- **Las muestras con un cociente M/P  $\geq 0,2$  y  $<0,3$  se consideran sospechosas.**  
Deben volver a analizarse las muestras con resultados sospechosos.
- **Las muestras con un cociente M/P  $\geq 0,3$  se consideran positivas.**  
Se han detectado anticuerpos específicos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

## Interpretación de los datos para las muestras de leche (protocolo durante toda la noche)

- **Las muestras con un cociente M/P <0,7 se consideran negativas.**  
No se han podido detectar anticuerpos específicos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
- **Las muestras con un cociente M/P ≥0,7 se consideran positivas.**  
Se han detectado anticuerpos específicos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

INDICAL ofrece una amplia gama de kits para ELISA así como kits para PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real para la detección de patógenos de animales.

Visite **[www.indical.com](http://www.indical.com)** para obtener más información sobre productos bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype y virotype.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o el manual del usuario del kit de INDICAL correspondiente.

## Acuerdo de licencia limitada para el cattletype MAP Ab

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual, así como con los componentes contenidos en el kit. INDICAL no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para incorporar o utilizar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, en este manual y en los protocolos adicionales disponibles en [www.indical.com](http://www.indical.com). Algunos de estos protocolos adicionales los han proporcionado usuarios de INDICAL para usuarios de INDICAL. INDICAL no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, INDICAL no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, INDICAL no garantiza que este kit y su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. INDICAL niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. INDICAL se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidos los costes procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit o con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite [www.indical.com](http://www.indical.com).

**Marcas comerciales:** bactotype<sup>®</sup>, cador<sup>®</sup>, cattletype<sup>®</sup>, flocktype<sup>®</sup>, pigtype<sup>®</sup>, virotype<sup>®</sup> (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); Milli-Q<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

HB-1615-ES-006 © 2021 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

## Índice de cambios

Manual	Versión	Cambio
HB-1615-EN-006	Enero de 2021	Producto LCM
HB-1615-EN-005	Junio de 2018	Diseño de INDICAL

# Guía rápida para cattletype MAP Ab

Dilución de la muestra:

Suero, plasma 1:20, mezclar bien

Leche 1:2

Paso	Suero, plasma	Leche
1. Preincubación	15 min-2 h a temp. ambiente o toda la noche a 2-8 °C	15 min-2 h a temp. ambiente
2. Transferencia		100 µl/pocillo
3. Incubación	30 min. a temp. ambiente	30 min a temp. ambiente o toda la noche a 2-8 °C
4. Lavado		3 × 300 µl
5. Conjugado		100 µl/pocillo
6. Incubación		30 min. a temp. ambiente
7. Lavado		3 × 300 µl
8. TMB		100 µl/pocillo
9. Incubación		10 min. a temp. ambiente
10. Parada		100 µl/pocillo
11. Lectura		450 nm

## Interpretación de los datos

Muestra	Negativa	Existe sospecha	Positiva
Suero, plasma	M/P <0,3	$0,3 \leq M/P < 0,4$	M/P $\geq 0,4$
Leche (protocolo corto)	M/P <0,2	$0,2 \leq M/P < 0,3$	M/P $\geq 0,3$
Leche (protocolo durante toda la noche)	M/P <0,7		M/P $\geq 0,7$