

cattletype[®] MAP Ab

Manuel

Pour la détection d'anticorps à
Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis*

Sous licence conformément à l'article 11 (2) de la loi allemande sur
l'hygiène vétérinaire : FLI-B 471

REF 5 plaques (réf. CT270803)

REF 20 plaques (réf. CT270805)*



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

* disponible uniquement sur demande.

Sommaire

Contenu du kit	3
Utilisation prévue	3
Symboles.....	4
Contrôle qualité	5
Stockage.....	5
Informations de sécurité	5
Introduction.....	6
Principe.....	6
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur.....	7
Remarques importantes.....	8
Précautions générales.....	8
Protocole : procédure de test ELISA.....	9
Points importants avant de commencer.....	9
À effectuer avant de commencer.....	9
Préparation des échantillons de lait	10
Procédure de test pour les échantillons de sérum et de plasma.....	11
Procédure de test pour échantillons de lait	13
Interprétation des données	15
Critères de validation	15
Calcul.....	15
Interprétation des résultats	16
Interprétation des données pour les échantillons de sérum et de plasma	16
Interprétation des données pour les échantillons de lait (protocole court).....	16
Interprétation des données pour les échantillons de lait (protocole avec livraison le lendemain).....	17
Historique des modifications.....	19
Guide rapide pour cattletype MAP Ab	20

Contenu du kit

cattletype MAP Ab	(5)	(20)
Réf.	CT270803	CT270805*
Nombre de plaques	5	20
Test Plate (plaque de test) : microplaque 96 puits, enrobée d'antigène MAP non infectieux	5	20
Sample Diluent (diluant d'échantillon), prêt à l'emploi	1 × 100 ml	1 × 400 ml
Negative Control (contrôle négatif), prêt à l'emploi	1 × 3,5 ml	2 × 3,5 ml
Positive Control (contrôle positif), prêt à l'emploi	1 × 3,5 ml	2 × 3,5 ml
Wash Buffer (tampon de lavage), concentré 10x	3 × 125 ml	2 × 500 ml
Conjugate (conjugué), prêt à l'emploi	1 × 60 ml	1 × 240 ml
TMB Substrate (substrat TMB), prêt à l'emploi	1 × 60 ml	1 × 240 ml
Stop Solution (solution d'arrêt), prêt à l'emploi	1 × 60 ml	1 × 240 ml
Manuel	1	1

* disponible uniquement sur demande.

Utilisation prévue

Le test cattletype MAP Ab est un test ELISA indirect pour la détection des anticorps à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) dans les échantillons de sérum, de plasma et de lait issus de bovins, moutons et chèvres.

Ce kit est approuvé par le Friedrich-Loeffler-Institut et octroyé sous licence conformément à l'article 11 (2) de la loi allemande sur l'hygiène vétérinaire (FLI-B 471) pour une utilisation en Allemagne à des fins de procédures diagnostiques en médecine vétérinaire.

Réservé exclusivement à un usage vétérinaire.

Symboles



Fabricant légal



Numéro de lot



À utiliser avant le



Limites de température pour le stockage



Manuel



Numéro de référence



Référence produit



Pour les échantillons de bovins, moutons et chèvres

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO d'INDICAL, chaque lot de cattletype MAP Ab est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Stockage

Les composants du test cattletype MAP Ab ELISA doivent être conservés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C et sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Les Wash Buffer (10x) et Stop Solution peuvent être conservés à température ambiante (18–25°C) pour éviter la cristallisation de sels. Si les barrettes de test sont fournies avec le kit, conservez les barrettes de test restantes dans le sachet en aluminium refermable, avec le déshydratant, entre 2 et 8 °C en attendant la prochaine utilisation. Les barrettes de test peuvent être conservées pendant au moins 6 semaines après l'ouverture du sachet de plaques.

Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles auprès des représentants d'INDICAL ou sur demande par e-mail à l'adresse compliance@indical.com.



ATTENTION : La Stop Solution contient de l'acide sulfurique à 0,5 M.

Tous les résidus d'échantillons et les objets qui ont été en contact avec les échantillons doivent être décontaminés ou éliminés comme des substances présentant un risque potentiel d'infection.

Introduction

Le test cattletype MAP Ab est une solution hautement sensible destinée à la détection des anticorps à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP).

MAP est l'agent responsable de la paratuberculose, aussi appelée maladie de Johne. La paratuberculose est une maladie infectieuse chronique et incurable présentant une durée d'incubation longue et caractérisée par une perte de poids excessive et une diarrhée persistante chez les bovins au stade final de la maladie. MAP est répandu dans le monde entier chez les ruminants. Le kit cattletype MAP Ab permet la détection semi-quantitative des anticorps anti-MAP. Il peut être utilisé avec des échantillons de sérum, de plasma et de lait.

Principe

Les échantillons sont d'abord dilués puis pré-incubés avec un Sample Diluent contenant un extrait de *Mycobacterium phlei* désactivé destiné à minimiser les réactions croisées aux mycobactéries atypiques. La microplaque est enrobée d'antigène MAP. Lors de l'incubation des échantillons, les anticorps spécifiques à MAP se lient à l'antigène

immobilisé. Le matériel non lié est éliminé par rinçage. Le Conjugate anti-IgG-HRP détecte les anticorps liés à l'antigène. Le Conjugate non lié est éliminé par rinçage. Une réaction colorimétrique est initiée par l'ajout d'une Substrate Solution et arrêtée après 10 minutes. En présence d'anticorps spécifiques à MAP dans l'échantillon, la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase, HRP) catalyse un développement de couleur bleue qui devient jaune après l'ajout de Stop Solution. La densité optique (DO) est mesurée dans un spectrophotomètre. Les valeurs de DO sont en corrélation avec la concentration d'anticorps anti-MAP dans l'échantillon.

Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

- Bêchers
- Éprouvettes graduées
- Pipettes (réglables)
- Pipettes multicanaux (réglables)
- Film d'aluminium ou adhésif pour couvrir la Test Plate
- Facultatif : Dispositif pour distribution et aspiration du Wash Buffer
- Lecteur d'absorbance pour plaque de microtitration
- Tubes ou plaques pour la dilution des échantillons
- Eau distillée

Remarques importantes

Précautions générales

L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants :

- Ne pas exposer la TMB Substrate Solution à une source de lumière intense ou aux rayons du soleil lors de la réalisation du test.
- Les composants du kit de test ne doivent pas être contaminés ou mélangés avec les composants d'autres lots.
- Ne pas utiliser les composants du kit de test après la date de péremption.
- L'eau provenant de systèmes échangeurs d'ions utilisés pour diluer le Wash Buffer (10x) peut interférer avec le test si elle n'est pas suffisamment pure. Utilisez de l'eau doublement distillée ou hautement purifiée (Milli-Q®).
- Pour des résultats de test fiables, il est essentiel durant les tests d'utiliser une verrerie propre, de pipeter et rincer avec soin et de respecter scrupuleusement les temps d'incubation.

Protocole : procédure de test ELISA

Points importants avant de commencer

- Lire les « Remarques importantes » à la page 8 avant de commencer.

À effectuer avant de commencer

- Porter les réactifs à température ambiante (18–25 °C) immédiatement avant leur utilisation. En cas de précipités de cristaux de sel dans le Wash Buffer (10x), dissoudre par un léger mouvement circulaire et par réchauffement.
- Diluer le Wash Buffer (10x) au 1:10 dans de l'eau distillée. Par exemple, pour une Test Plate, diluer 25 ml de Wash Buffer (10x) dans 225 ml d'eau distillée et mélanger.
- Échantillons de sérum/plasma : avant d'analyser les échantillons de sérum/plasma, diluer 1:20 dans du Sample Diluent (p. ex. diluer un échantillon de 10 µl dans 190 µl de Sample Diluent) et bien mélanger. Utiliser des tubes en plastique ou des microplaques non enrobées pour la dilution et la pré-incubation. Changer les pointes de pipette pour chaque échantillon.
- Les contrôles sont prêts à l'emploi et ne nécessitent pas de dilution pour tester le sérum/plasma.

Remarque : lors du test d'échantillons de lait dans le cadre du protocole avec livraison le lendemain, les contrôles doivent être dilués directement dans la plaque de test.

Préparation des échantillons de lait

Avant l'analyse des échantillons, les échantillons de lait doivent être dégraissés. Centrifuger les échantillons de lait entier pendant 10 minutes à 3000 x g à 10 °C ou stocker les échantillons entre 2 et 8 °C jusqu'au lendemain. Puis retirer la crème.

Prélever les échantillons de lait sous la couche de crème. Si nécessaire, utiliser une pointe différente pour prélever l'échantillon et pour pénétrer dans la couche de crème. Éviter que la crème du lait ne soit transférée aux puits de la microplaque, car cela peut causer des réactions non spécifiques.

Diluer le lait dégraissé à 1:2 à l'aide de Sample Diluent, par exemple, diluer 70 µl d'échantillon dans 70 µl de Sample Diluent et bien mélanger. Changer les pointes de pipette pour chaque échantillon.

Procédure de test pour les échantillons de sérum et de plasma.

Lire « À effectuer avant de commencer » à la page 9.

Procédure

1. Pré-incuber pendant 15 min à 2 heures à température ambiante (18 à 25 °C) ou jusqu'au lendemain (14 à 22 heures) entre 2 et 8 °C.

Fermer les tubes en plastique et couvrir la plaque de pré-incubation (avec un couvercle ou un film adhésif).

2. Pipeter 100 µl de Negative Control (en double) et de Positive Control (en double) dans les puits appropriés de la Test Plate.
3. Pipeter 100 µl de l'échantillon pré-incubé dans les puits restants, puis mélanger.

Remarque : noter les positions des contrôles et des échantillons dans un protocole de test. L'utilisation de pipettes multicanaux est recommandée pour le transfert des échantillons. Couvrir la Test Plate.

4. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (18–25 °C).
5. Retirer la solution des puits par aspiration ou par tapotement.
6. Rincer chaque puits 3x avec 300 µl de Wash Buffer préparé (1x). Retirer le tampon après chaque rinçage par aspiration ou par tapotement.
7. Pipeter 100 µl de Conjugate prêt à l'emploi dans chaque puits et incuber pendant 30 minutes à température ambiante (18 à 25 °C).
8. Retirer la solution des puits par aspiration ou par tapotement.

9. Rincer chaque puits 3x avec 300 µl de Wash Buffer préparé (1x). Retirer le tampon après chaque rinçage par aspiration ou par tapotement.
10. Pipeter 100 µl de TMB Substrate Solution dans chaque puits.
11. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Commencer à chronométrer après avoir rempli le premier puits.
12. Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de Stop Solution par puits. Ajouter la Stop Solution dans le même ordre que celui dans lequel la Substrate Solution a été ajoutée.
13. Mesurer la DO dans le lecteur de plaque à 450 nm dans les 20 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

La mesure à une longueur d'onde de référence (620–650 nm) est facultative.

Procédure de test pour échantillons de lait

- Lire « À effectuer avant de commencer » à la page 9.
- Les échantillons de lait peuvent être testés selon le protocole court ou le protocole avec livraison le lendemain.
Protocole court : Les contrôles sont prêts à l'emploi. Veuillez suivre les étapes 2a et 4a.
Protocole avec livraison le lendemain : Diluer les contrôles à 1:2 et envisager les étapes 2b et 4b.

Procédure

1. Pré-incuber les échantillons dilués pendant 15 min à 2 heures à température ambiante (18–25 °C).
Fermer les tubes en plastique et couvrir la plaque de pré-incubation (avec un couvercle ou un film adhésif).
2. Diluer les contrôles du kit selon le protocole de test choisi (court ou avec livraison le lendemain) :
 - 2a. **Protocole court** : Pipeter 100 µl de Negative Control (en double) et de Positive Control (en double) dans les puits appropriés de la Test Plate.
 - 2b. **Protocole avec livraison le lendemain** : Pipeter 50 µl de Sample Diluent dans 4 puits de la Test Plate. Pipeter 50 µl de Negative et Positive Control (en double) dans les puits appropriés, puis bien mélanger.
3. Pipeter 100 µl des échantillons pré-incubés dans les puits de la Test Plate.

Remarque : noter les positions des contrôles et des échantillons dans un protocole de test. L'utilisation de pipettes multicanaux est recommandée pour le transfert des échantillons. Couvrir la Test Plate.

4. Incuber les échantillons selon le protocole de test choisi (court ou avec livraison le lendemain) :
- 4a. **Protocole court** : Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (18–25 °C)
- 4b. **Protocole avec livraison le lendemain** : Incuber la nuit (14–22 h) à 2-8 °C.
5. Retirer la solution des puits par aspiration ou par tapotement.
6. Rincer chaque puits 3x avec 300 µl de Wash Buffer préparé (1x). Retirer le tampon après chaque rinçage par aspiration ou par tapotement.
7. Pipeter 100 µl de Conjugate prêt à l'emploi dans chaque puits et incuber pendant 30 minutes à température ambiante (18 à 25 °C).
8. Retirer la solution des puits par aspiration ou par tapotement.
9. Rincer chaque puits 3x avec 300 µl de Wash Buffer préparé (1x). Retirer le tampon après chaque rinçage par aspiration ou par tapotement.
10. Pipeter 100 µl de TMB Substrate Solution dans chaque puits.
11. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Commencer à chronométrer après avoir rempli le premier puits.
12. Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de Stop Solution par puits. Ajouter la Stop Solution dans le même ordre que celui dans lequel la Substrate Solution a été ajoutée.

13. Mesurer la DO dans le lecteur de plaque à 450 nm dans les 20 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

La mesure à une longueur d'onde de référence (620–650 nm) est facultative.

Interprétation des données

Critères de validation

Les résultats sont valables si les critères suivants sont remplis :

- La valeur moyenne (VM) de la DO mesurée pour le Positive Control (PC) doit être $\geq 0,6$.
- La VM de la DO mesurée pour le Negative Control (NC) doit être $\leq 0,25$.

Si les tests sont non valides, ils doivent être répétés après avoir attentivement consulté les instructions d'utilisation.

Calcul

Calculer les valeurs moyennes (VM) de la DO mesurée pour le Negative Control (NC) et le Positive Control (PC).

Le rapport (E/P) entre la DO de l'échantillon et la DO moyenne du Positive Control est calculé selon l'équation suivante :

$$E/P = \frac{DO_{\text{échantillon}} - VM DO_{\text{NC}}}{VM DO_{\text{PC}} - VM DO_{\text{NC}}}$$

Interprétation des résultats

Interprétation des données pour les échantillons de sérum et de plasma

- **Les échantillons ayant un rapport E/P < 0,3 sont négatifs.**
Les anticorps spécifiques à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* n'ont pas pu être détectés.
- **Les échantillons ayant un rapport E/P est $\geq 0,3$ et < 0,4 sont suspects.**
Les échantillons avec des résultats suspects doivent être retestés.
- **Les échantillons ayant un rapport E/P $\geq 0,4$ sont positifs.**
Les anticorps spécifiques à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ont été détectés.

Interprétation des données pour les échantillons de lait (protocole court)

- **Les échantillons ayant un rapport E/P < 0,2 sont négatifs.**
Les anticorps spécifiques à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* n'ont pas pu être détectés.
- **Les échantillons ayant un rapport E/P est $\geq 0,2$ et < 0,3 sont suspects.**
Les échantillons avec des résultats suspects doivent être retestés.
- **Les échantillons ayant un rapport E/P $\geq 0,3$ sont positifs.**
Les anticorps spécifiques à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ont été détectés.

Interprétation des données pour les échantillons de lait (protocole avec livraison le lendemain)

- **Les échantillons ayant un rapport E/P < 0,7 sont négatifs.**
Les anticorps spécifiques à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* n'ont pas pu être détectés.
- **Les échantillons ayant un rapport E/P ≥ 0,7 sont positifs.**
Les anticorps spécifiques à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ont été détectés.

INDICAL propose une gamme de kits ELISA et de kits PCR et RT-PCR en temps réel pour la détection des agents pathogènes chez les animaux.

Consulter le site www.indical.com pour plus d'informations sur les produits bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype et virotype.

Pour obtenir des informations actualisées sur la licence et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation INDICAL correspondant.

Contrat de licence limitée pour cattletype MAP Ab

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel, et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. INDICAL n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.indical.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs INDICAL pour des utilisateurs INDICAL. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par INDICAL. INDICAL ne saurait être tenue pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, INDICAL n'offre aucune garantie que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. INDICAL rejette notamment toutes autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. INDICAL est susceptible de faire appliquer les interdictions de ce contrat de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais d'investigation et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de ce contrat de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour les conditions de licence mises à jour, consulter www.indical.com.

Marques commerciales : bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, pigtype®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); Milli-Q® (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne). Les noms déposés, les marques de commerce, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

HB-1615-FR-006 © 2018-2021 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, tous droits réservés.

Historique des modifications

Manuel	Version	Modification
HB-1615-EN-006	Janvier 2021	LCM de produit
HB-1615-EN-005	Juin 2018	Style INDICAL

Guide rapide pour cattletype MAP Ab

Dilution de l'échantillon :

Sérum, plasma 1:20, bien mélanger Lait 1:2

Étape	Sérum, plasma	Lait
1. Pré-incubation	15 min – 2 h à temp. amb. ou avec livraison le lendemain 2-8 °C	15 min – 2 h à temp. amb.
2. Transfert		100 µl/puits
3. Incubation	30 min à temp. amb.	30 min à temp. amb. ou avec livraison le lendemain 2-8 °C
4. Lavage		3 x 300 µl
5. Conjugué		100 µl/puits
6. Incubation		30 min à temp. amb.
7. Lavage		3 x 300 µl
8. TMB		100 µl/puits
9. Incubation		10 min à temp. amb.
10. Arrêt		100 µl/puits
11. Lecture		450 nm

Interprétation des données

Échantillon	Négatif	Suspect	Positif
Sérum, plasma	$E/P < 0,3$	$0,3 \leq E/P < 0,4$	$E/P \geq 0,4$
Lait (protocole court)	$E/P < 0,2$	$0,2 \leq E/P < 0,3$	$E/P \geq 0,3$
Lait (protocole avec livraison le lendemain)	$E/P < 0,7$		$E/P \geq 0,7$