

# bactotype<sup>®</sup> MAP PCR Kit

## Manual de uso

Para la detección de ADN del  
*Mycobacterium avium* subsp.  
*paratuberculosis*

---

Certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal, n.º MA: FLI-B 651

**REF** 96 reacciones (n.º de catálogo BT285905)



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

# Contenido

Contenido del kit .....	3
Uso previsto.....	3
Símbolos.....	4
Control de calidad.....	5
Almacenamiento .....	5
Información de seguridad .....	5
Introducción .....	6
Principio.....	6
Extracción del ADN .....	7
Pretratamiento de muestras fecales .....	8
Pretratamiento de muestras de tejido.....	9
Pretratamiento de cultivos inclinados.....	9
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario.....	10
Notas importantes.....	11
Precauciones generales.....	11
Protocolo: PCR en tiempo real para la detección de ADN de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> .....	13
Cuestiones importantes antes de comenzar .....	13
Antes de comenzar .....	13
Procedimiento .....	14
Análisis e interpretación de los datos .....	16
Interpretación de los resultados .....	16
Índice de cambios.....	20

## Contenido del kit

bactotype MAP PCR Kit	(96)
N.º de catálogo	BT285905
Número de reacciones	96
Master Mix (mezcla maestra) (tubo con tapón naranja); incluye enzimas, primers y sondas	2 × 840 µl
Internal Control DNA (ADN de control interno) (tubo con tapón transparente)	1 × 110 µl
Positive Control (control positivo) (tubo con tapón rojo)	1 × 170 µl
Negative Control (control negativo) (tubo con tapón azul)	1 × 170 µl
Manual de uso	1

## Uso previsto

El bactotype MAP PCR Kit se ha diseñado para detectar ADN del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) a partir de muestras fecales y de tejido (p. ej., intestino delgado, ganglios linfáticos mesentéricos) procedentes de rumiantes y cultivos inclinados (muestras individuales y agrupadas). Se pueden analizar hasta 5 muestras individuales de manera agrupada.

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 651) 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 de uso



Número de catálogo



Número de material



Proteger de la luz



Para muestras de rumiantes

## Control de calidad

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

## Almacenamiento

Los componentes del bactotype MAP PCR Kit deben almacenarse a una temperatura comprendida entre  $-30\text{ °C}$  y  $-15\text{ °C}$  y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Evite repetir el ciclo de descongelación-congelación (>2 veces), ya que esta práctica reduce la sensibilidad del ensayo. Congele los componentes en alícuotas únicamente si van a utilizarse de forma intermitente.

## 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).

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 bactotype MAP PCR Kit es una solución altamente sensible y específica para la detección de ADN del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) en muestras de rumiantes. El MAP es el causante de la paratuberculosis (también conocida como enfermedad de Johne), una enfermedad inflamatoria intestinal crónica de los rumiantes presente en todo el mundo. Pueden infectarse los rumiantes domésticos y silvestres, así como los camélidos. Los signos y síntomas clínicos tales como la diarrea crónica, el edema y el adelgazamiento progresivo tienen lugar en una fase tardía de la enfermedad, tras varios años de incubación. El adelgazamiento es más habitual que la diarrea en los rumiantes pequeños. La paratuberculosis es una enfermedad incurable y mortal.

La alta sensibilidad del bactotype MAP PCR Kit permite la detección del patógeno tanto en muestras recientes como en cultivadas.

## Principio

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma de un patógeno. En la PCR en tiempo real, el producto amplificado se detecta mediante marcadores de fluorescencia. Estos suelen estar ligados a sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente al producto amplificado. La supervisión de las intensidades de la fluorescencia durante la serie de PCR (es decir, en tiempo real) permite detectar el producto acumulado sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción posteriormente.

El bactotype MAP PCR Kit contiene todos los reactivos necesarios para la detección de ADN de MAP, incluidos un Positive Control, un Negative Control y un Internal Control.

El Internal Control DNA permite comprobar el éxito de la purificación y la amplificación añadiéndolo al procedimiento de purificación de ADN.

El kit utiliza dos combinaciones específicas de primer/sonda: una para el ADN de MAP que produce una fluorescencia FAM™ y otra para el control interno que produce una fluorescencia MAX™.

El Positive Control contiene ADN de MAP y sirve para probar la funcionalidad del ensayo del patógeno; p. ej., que la mezcla de reacción se ha configurado correctamente.

## Extracción del ADN

El bactotype MAP PCR Kit puede utilizarse para la detección de ADN de MAP en muestras fecales y de tejido (p. ej., intestino delgado, ganglios linfáticos mesentéricos) procedentes de rumiantes y cultivos inclinados. Se pueden analizar hasta 5 muestras individuales de manera agrupada.

### Recomendación para la manipulación de muestras fecales:

transporte las muestras fecales a 4 °C o a una temperatura comprendida entre -30 °C y -15 °C.

Antes de realizar la PCR en tiempo real, debe extraerse ADN del material de partida. El Internal Control DNA debe añadirse al tampón

de lisis antes del procedimiento de extracción. En la mayoría de los casos, es adecuado 1 µl de Internal Control DNA por muestra. Para obtener más información consulte los protocolos complementarios específicos de cada tipo de muestra.

INDICAL ofrece una amplia gama de kits validados diseñados para la extracción de ADN de muestras de animales

#### Extracción basada en microesferas magnéticas:

- **IndiMag® Pathogen Kit\*** (SP947457)
- **IndiMag Pathogen Kit\* w/o plastics** (SP947257)
- **IndiMag Pathogen IM2 Cartridge** (SP957654C608)
- **IndiMag Pathogen IM48 Cartridge** (SP947654P608, SP947654P224)
- **IndiMag Pathogen KF96 Cartridge** (SP947855P196)

#### Extracción basada en columnas de centrifugado:

- **IndiSpin® Pathogen Kit\*** (SP54104, SP54106)
- **IndiSpin QIAcube® HT Pathogen Kit** (SP54161)

**Nota:** es necesario realizar pretratamientos específicos según el tipo de muestra.

## Pretratamiento de muestras fecales

El material de partida debe mezclarse bien antes de extraer el ADN de MAP de las muestras fecales. A menudo, el patógeno está distribuido de forma desigual en las muestras.

Después, la muestra se homogeneiza en el tampón de lisis. Para garantizar una homogeneización correcta debe utilizarse una matriz de lisis (microesferas) adecuada y un instrumental apto.

Su representante de ventas local tiene disponibles protocolos adicionales complementarios para la extracción de ADN de MAP a partir de muestras fecales o puede solicitarlos a través del correo electrónico [support@indical.com](mailto:support@indical.com).

También es posible utilizar otros métodos de extracción validados para el tratamiento de muestras fecales positivas en MAP (p. ej., que contienen pasos adicionales de concentraciones).

## Pretratamiento de muestras de tejido

Su representante de ventas local tiene disponibles protocolos adicionales complementarios para la extracción de ADN de MAP a partir de muestras fecales o puede solicitarlos a través del correo electrónico [support@indical.com](mailto:support@indical.com).

## Pretratamiento de cultivos inclinados

Es posible realizar la extracción de ADN de MAP de cultivos inclinados (en PBS o en solución de cloruro de sodio al 0,9 %) utilizando alguno de los kits recomendados. **Note:** use el Pretratamiento B2 para bacterias difíciles de lisar en fluidos acelulares.

Si la PCR en tiempo real no se realiza inmediatamente después de la extracción, almacene el ADN a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o bien, para un almacenamiento más prolongado, a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La extracción de ADN con kits basados en la tecnología de columnas de centrifugado puede automatizarse con el uso de QIAcube®.

## 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 (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Pipetas
- Puntas de pipeta exentas de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros
- Tubos Eppendorf® de 1,5 ml estériles
- Consumibles exentas de nucleasas (sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa). Debe prestarse especial atención para evitar la contaminación con nucleasas de todos los reactivos y consumibles utilizados para configurar la PCR a fin de realizar una identificación sensible de los ácidos nucleicos víricos
- Instrumentos y consumibles para la homogeneización y la disrupción mecánica de muestras
- Dispositivo para enfriamiento o hielo
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de 1,5 ml

- Termociclador en tiempo real con canales de fluorescencia adecuados
- Software adecuado para el termociclador en tiempo real elegido
- Tubos y tapones de tiras adecuados o microplaca óptica de 96 pocillos con película adhesiva óptica o tapa para el termociclador en tiempo real elegido

## Notas importantes

### Precauciones generales

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

- Utilice puntas de pipeta exentas de nucleasas con filtros.
- Almacene y extraiga el material positivo (muestras, controles positivos y amplicones) en procedimientos independientes con respecto al resto de reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en una sala separada físicamente.
- Descongele todos los componentes en hielo antes de iniciar un ensayo.
- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes mediante inversión y centrifúgelos brevemente.
- No utilice los componentes del kit de prueba si están caducados.
- Conserve las muestras y los controles en hielo o en un bloque de enfriamiento durante la configuración de las reacciones.

## Control negativo

Como mínimo debe incluirse una reacción de control negativo en cada serie de PCR, que contenga todos los componentes de la reacción, excepto la secuencia del patógeno. Esta acción permite evaluar la contaminación de la reacción.

## Control positivo

Si el procedimiento de la PCR se realiza en muestras no conocidas, se recomienda efectuar una reacción de control positivo en la serie de PCR que contenga una muestra que se sepa que incluye el ADN bacteriano diana. Un control positivo permite demostrar la funcionalidad del ensayo del patógeno, p. ej., que la mezcla de reacción se ha configurado correctamente. Utilice 8 µl del Positive Control suministrado con el bactotype MAP PCR Kit para probar que la diana se ha amplificado correctamente.

## Control de la extracción y la amplificación

Para una mayor seguridad y comodidad del proceso, se incluye un ensayo de control de extracción y amplificación en forma de Internal Control DNA. Se recomienda encarecidamente añadir el Internal Control DNA a la solución de lisis de la muestra para supervisar la extracción y la amplificación.

# Protocolo: PCR en tiempo real para la detección de ADN de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

## Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea el apartado “Notas importantes” en la página 11 antes de comenzar.
- Se suministra el Internal Control DNA. Esto permite al usuario controlar el procedimiento de aislamiento de ADN y buscar una posible inhibición de la PCR. El control interno debe añadirse directamente a la lisis
- Incluya como mínimo un control positivo (Positive Control) y un control negativo (Negative Control) para cada serie de PCR.
- Antes de comenzar el procedimiento, lea detenidamente el protocolo y familiarícese con el funcionamiento del termociclador para PCR en tiempo real elegido.
- Lleve a cabo el protocolo sin interrupción.

## Antes de comenzar

- Descongele todos los reactivos en hielo y protéjalos de la luz.
- Conserve los reactivos en hielo durante la configuración de la PCR.
- Antes de utilizarlos, centrifugue brevemente los reactivos.

## Procedimiento

1. Pipetee 17  $\mu\text{l}$  de la Master Mix en cada tubo de reacción. Después, añada 8  $\mu\text{l}$  del ADN de muestra (tabla 1).

Incluya reacciones de control positivo y negativo.

Positive Control: utilice 8  $\mu\text{l}$  del control positivo (Positive Control) en lugar de ADN de muestra.

Negative Control: utilice 8  $\mu\text{l}$  del control negativo (Negative Control) en vez de ADN de muestra.

Tabla 1. Preparación de la mezcla de reacción

Componente	Volumen
Master Mix	17 $\mu\text{l}$
Muestra	8 $\mu\text{l}$
<b>Volumen total</b>	<b>25 <math>\mu\text{l}</math></b>

2. Cierre los tubos de reacción con los tapones correspondientes.
3. Defina los filtros para los marcadores indicador en el software del termociclador de acuerdo con la tabla 2.

Tabla 2. Configuración de los filtros para el indicador

Patógeno/control interno	Indicador
MAP	FAM
Internal Control	MAX <sup>1</sup> / HEX/ JOE <sup>2</sup>
Referencia pasiva <sup>3</sup>	ROX

1 MAX NHS Ester como marcador indicador tiene una excitación/emisión máxima de 524/557 nm, lo que permite la detección en el mismo canal que HEX o JOE y, por lo tanto, puede usarse con los mismos termocicladores en tiempo real.

2 Utilice la opción apropiada para su termociclador.

3 Referencia interna para el uso con Applied Biosystems® 7500.

**Nota:** Al usar el Rotor-Gene® Q, establezca una ganancia fija de +4 en el canal verde y de +1 en el canal amarillo para asegurar ganancias de fluorescencia óptimas para MAP y los ensayos de Internal Control.

4. Ejecute el protocolo de PCR en tiempo real de acuerdo con la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de PCR en tiempo real para bactotype MAP

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
<b>Activación inicial</b>	95 °C	15 min	1
<b>Ciclado en 3 pasos</b>			
Desnaturalización	95 °C	15 s	
Hibridación*	60 °C	30 s	40
Extensión	72 °C	35 s	

\* Recopilación de datos de fluorescencia.

# Análisis e interpretación de los datos

## Interpretación de los resultados

Para que el ensayo tenga validez, el Positive Control debe emitir una señal en los canales FAM y MAX/HEX con un  $C_T^1 < 35$ . El Negative Control no debe emitir una señal en los canales FAM y MAX/HEX.

Los resultados siguientes pueden obtenerse si se trabaja con muestras no conocidas. Los resultados posibles de las muestras también se resumen en la tabla 4 en la página 18.

**Nota para los usuarios de ABI 7500 Real-Time PCR Systems:** Los usuarios de ABI 7500 deben tener en cuenta que confiar únicamente en el ajuste automático del umbral (Auto CT) y el ajuste automático de los valores de referencia (Auto Baseline) podría conllevar que el software realizara una interpretación errónea de los resultados. Los resultados deben ajustarse y verificarse siempre mediante el ajuste manual de umbral, y anular la selección del ajuste "Auto CT" y "Auto Baseline" respectivamente, donde corresponda. Consulte las directrices del instrumento para obtener más información sobre cómo realizar los ajustes de análisis adecuados.

---

<sup>1</sup> Ciclo umbral ( $C_T$ ): ciclo en que el gráfico de amplificación cruza el umbral, es decir, cuando aparece el primer aumento claramente detectable de la fluorescencia.

**Para que la muestra se considere positiva para el MAP y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:**

- La muestra emite una señal en los canales FAM y MAX/HEX.
- El Positive Control emite una señal en los canales FAM y MAX/HEX.
- El Negative Control no emite una señal en los canales FAM y MAX/HEX.

Tenga en cuenta que unas concentraciones muy elevadas de ADN de MAP en la muestra pueden reducir la señal MAX/HEX o incluso suprimirla debido a la competición con el control interno.

**Para que la muestra se considere negativa para MAP y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:**

- La muestra emite una señal en el canal MAX/HEX, pero no en el canal FAM.
- El Positive Control emite una señal en los canales FAM y MAX/HEX.
- El Negative Control no emite una señal en los canales FAM y MAX/HEX.

Una señal MAX/HEX positiva significa que la extracción y la amplificación se han realizado correctamente.

**Para que los resultados de la muestra se consideren no concluyentes y el ensayo no sea válido, debe ocurrir la circunstancia siguiente:**

- La muestra no emite ninguna señal en los canales FAM y MAX/HEX.

Si no se detecta una señal en los canales FAM (patógeno) y MAX/HEX (Internal Control, IC), el resultado es no concluyente. La ausencia de

señal para el Internal Control indica la inhibición de la PCR u otro error.

Para realizar una comprobación de inhibición, recomendamos una dilución 1:5 del ADN de muestra en agua sin nucleasa, para repetir la extracción del ADN, o repetir todo el procedimiento de prueba comenzando con nuevo material de muestra.

Compruebe que no haya una señal de fluorescencia en el capan FAM para la reacción del control positivo (Positive Control). La ausencia de señal para el Positive Control indica que se ha producido un error, que podría deberse a una configuración incorrecta de la mezcla de reacción o a condiciones inadecuadas de los ciclos.

Tabla 4. Tabla de interpretación de resultados<sup>1</sup>

<b>Resultado de la muestra</b>	<b>FAM (MAP)</b>	<b>MAX/HEX (IC)</b>
Positivo en el MAP	X	X
Positivo en MAP (positivo alto)	X	
Negativo en MAP		X
No concluyente		

<sup>1</sup> La interpretación de los resultados de las muestras puede determinarse siempre que se realicen reacciones de control positivo y negativo. El Positive Control debe emitir una señal en los canales FAM y MAX/HEX. El Negative Control no debe emitir ninguna señal en los canales FAM y MAX/HEX. Para obtener una explicación detallada de los resultados posibles de las muestras, consulte el apartado “Análisis e interpretación de los datos” en la página 16.

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 afosa, bactotype, cador, cattletype, flocktype, IndiField, IndiMag, IndiMix, IndiSpin, pigtype, SVANOVIR 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 bactotype MAP PCR Kit

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 de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. INDICAL no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual y 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/o 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 y/o con sus componentes.

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

**Marcas comerciales:** bactotype®, cadof®, cattletype®, flocktype®, IndiMag®, IndiSpin®, pigtype®, SVANOVIR®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); QIAcube®, Rotor-Gene® (QIAGEN GmbH); Applied Biosystems® 7500 (Applied Biosystems); MAX™ (Integrated DNA Technologies, Inc.); FAM™, HEX™, JOE™, ROX™ (Life Technologies Corporation); Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Las sondas de las que se ha obtenido licencia han sido fabricadas por Integrated DNA Technologies, Inc. Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

HB-1746-007 © 2018-2025 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

## Índice de cambios

Manual de uso	Versión	Cambio
HB-1746-ES-007	Febrero 2025	Descontinuación 24 y 480 reacciones; implementación de un nuevo kit de extracción
HB-1746-EN-006	Junio 2018	Diseño de INDICAL; modificaciones en el capítulo "Extracción del ADN"