

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM PARATUBERCULOSIS

Prod Ref: 12.PTB.K1

Ensayo inmunoenzimático indirecto para la detección de anticuerpos específicos frente a *M.avium paratuberculosis* en muestras de suero de rumiantes y leche bovina.

Indirect immunoenzymatic assay for detection of specific antibodies to *M.avium paratuberculosis* in serum ruminant samples and bovine milk samples.

Última revisión / Last Revision: 30-09-21 / 30-09-21
Registrado en España con nº

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	2 Placas (T) 2 Plates		5 Placas (T) 5 Plates	
	Uni.	vol.	Uni.	vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras, tapizadas con antígeno de MAP. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8) coated with MAP antigen.	2	-	5	-
Control Positivo. Positive Control.	1	0.25ml	2	0.25 ml
Control Negativo Negative Control.	1	0.25ml	2	0.25 ml
Diluyente de muestra con M.phlei (DEMP-01) M.phlei sample diluent (DEMP-01)	1	30ml	2	30 ml
Conjugado con peroxidasa listo para su uso Peroxidase conjugate ready to use	1	30 ml	2	30 ml
Solución de lavado concentrada 25x. 25x concentrated washing solution.	1	125 ml	1	125 ml
Sustrato TMB a la dilución de uso. Bottles with substrate ready to use.	1	30 ml	1	60 ml
Solución de frenado. Stop solution.	1	60 ml	1	60 ml

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT
OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT:

Agua destilada o desionizada
Micropipetas de 5 a 200 µl.
Puntas de micropipeta de un solo uso
Dispositivos para lavado de placas.
Probetas de 50-250ml
Lector ELISA (filtro de 450 nm)

Distilled or deionised water.
Micropipettes from 5 to 200 µl.
Disposable micropipette tips.
Washing plates device.
Test tubes from 50 to 250 ml
ELISA Reader (450 nm filter)

I. FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

Este inmunoensayo enzimático (ELISA) se ha desarrollado para detectar la presencia de anticuerpos específicos del *Micobacterium avium* spp *paratuberculosis* (MAP) en muestras de leche bovina o sueros de rumiantes. Las muestras deben preincubarse con un diluyente con *Micobacterium phlei* para eliminar crosreacciones y a continuación se incuban sobre los pocillos sensibilizados con antígeno MAP. Tras un primer lavado, se añade un conjugado anti-IgG rumiante. Tras un segundo

lavado, se añade el sustrato, el cual en caso de reacción positiva desarrollará un color azul. Tras 15 minutos la reacción se frena pasando el color de azul a amarillo y éste se cuantifica en un lector de ELISA. El color en los pocillos indica la presencia de anticuerpos específicos de MAP. Cuánto más alta sea la concentración de anticuerpos en la muestra más intenso será el color en el pocillo y por tanto mayor la densidad óptica (DO).

II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
6. No comer, beber, ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. **¡IMPORTANTE!** El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al bote.
11. La solución de frenado ha de ser manipulada con precaución ya que es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con agua abundante.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2°C y +8°C).

IV. INFORMACIÓN SOBRE EL MODO DE REALIZAR LOS LAVADOS

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300 µl por pocillo. Tras las incubaciones, realizar los lavados según las siguientes instrucciones:

- Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso tantas veces sea indicado en el procedimiento.
- Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

V. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Diluir y preincubar las muestras en diluyente verde que contiene el *M. phlei* (DEMP-01) en una placa vacía o en viales de poco volumen.

Leches:

Se puede usar tanto leche entera como leche desnatada o parcialmente desnatada o lactosuero.

Hacer una dilución ½ de la muestra de leche (60 µl de las muestras de leche + 60 µl del diluyente)

Sueros:

Hacer una dilución 1/20 de la muestra de suero. (6 µl de las muestras de suero + 114 µl del diluyente)

Las muestras así diluidas se preincuban 30 min y posteriormente se transfieren 100 µl de la mezcla a la placa antigenada suministrada en el kit.

VI. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Solución de lavado:**
 Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit, con 24 partes de agua destilada (40 ml de concentrado más 960 ml de agua destilada). La solución permanece estable entre +2°C y +8°C, al menos 3 meses
- Preparación de diluyente de muestra DEMP-01:**
 Está listo para uso, NO DILUIR. Agitar antes de usar.
- Controles positivo y negativo:**
 Los controles deben tratarse como las muestras de suero, es decir, se ensayarán a la 1/20 en diluyente DEMP-01 (6 µl + 114 µl de diluyente)
- Conjugado:**
 Está listo para uso, NO DILUIR

VII. PROCEDIMIENTO

- Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes a temperatura ambiente.
- Tal como se indicó en la sección V, dispensar en pocillos de una microplaca vacía las siguientes cantidades de reactivos:
Leches: añadir 60 µl de las leches a testar sobre 60µl de diluyente de muestra.
Sueros y controles: añadir 6µl de controles y sueros a testar sobre 114µl del diluyente de muestra.
 Mantener **30 min ± 3 min a 22-26°C**. Recomendamos la realización de los controles por duplicado.
- Transferir 100 µl de las leches/sueros y controles de la placa de predilución a la placa tapizada suministrada con el kit. Tapar la placa e incubar **45 min ± 4 min a 22-26°C**.
- Lavar 3 veces con solución de lavado según el procedimiento descrito.
- Añadir 100µl del conjugado listo para su uso a cada pocillo. Tapar la placa e incubar **30min ± 3 min a 22-26°C**
- Lavar 3 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
- Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo, agitar suavemente y mantener la reacción durante **15 min a 22-26°C** en oscuridad.
- Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo en el mismo orden en que se dispuso el sustrato.
- Leer los valores de absorbancia a 450 nm dentro de los siguientes 5 minutos.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

A. Cálculo de S/P %

Si las muestras y controles se han ensayado por duplicado, hallar la media aritmética de las dos absorbancias obtenidas.

Para calcular la relación S/P en % realizar la siguiente operación:

$$S/P\% = \frac{(\text{DO Muestra} - \text{DO C Neg})}{(\text{DO C pos} - \text{DO C neg})} \times 100$$

B. Validación del test

El test se considerará válido cuando:

- DO C. Pos $\geq 0,75$
- DO C. Neg $< 0,2$

C. Interpretación

Leches:

- S/P % de la muestra ≥ 30 se considera positivo.
- S/P % de la muestra ≤ 20 se considera negativo.
- S/P % de la muestra comprendida entre ambos valores será considerada dudosa.

Sueros:

- S/P % de la muestra ≥ 55 se considera positivo.
- S/P % de la muestra ≤ 45 se considera negativo.
- S/P % de la muestra comprendida entre ambos valores será considerada dudosa.

I. TECHNICAL BASIS

This enzymatic immunoassay (ELISA) has been developed for the detection of specific antibodies to *Micobacterium avium ssp paratuberculosis* (MAP) in ruminant serum and bovine milk samples. Samples must be preincubated with a diluent with a *Micobacterium phlei* to eliminate crossreactions and then incubate in the wells coated with MAP antigen. After a first washing

step, the anti-ruminant IgG conjugate is added and after a second wash, the substrate is dispensed. The colour development indicates the presence of specific antibodies to MAP. The more concentration of antibodies it has, the more intensity of colour it develops, and therefore, the optical density (OD) will be higher.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits.
4. Avoid any contamination of the reagents of the Kit.
5. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. For each utilisation of the kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
10. **IMPORTANT!** Substrate must be handle with care, it is very sensitive to light and contamination. Remove the volume to use from the bottle and never put the remaining volume back into it.
11. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored between +2°C and +8°C.

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

The washing steps could be done using an automatic microplate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl on each well.

After the incubation periods, the washing steps must be done following the next instructions:

- Throw out the content of the plate by a brusque turnover of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µl of washing solution on each well.
- Shake delicately the plate, avoiding the contamination between wells.
- Turn over the plate brusquely to empty the wells.
- Repeat the process as much times as it is indicated on the instructions of the Kit.
- Prior to empty the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not maintain the plate on dry more time than strictly needed.
- After the last step of washing, shake the plate turned over on an absorbent filter paper.

V. PREPARATION OF SAMPLES:

Dilute and pre-incubate samples with M. phlei green diluent (DEMP-01). These mixes must be done in wells of empty predilution microplate or in low volume vials.

Milk:

Both whole milk and skimmed or partially skimmed milk or whey can be tested. Samples must be diluted 1/2 in diluent (60µl milk samples + 60µl diluent).

Sera:

Samples must be diluted 1/20 in diluent (6 µl serum samples + 114 µl diluent)

Diluted samples must be preincubated 30 min and then 100 µl of the mixture is transferred to the antigen plate supplied in the kit.

VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit with 24 parts of distilled water or deionized water (40 ml of concentrate solution and 960 ml of water). This solution remains stable between +2°C and +8°C at least 3 months

- **Diluent of samples (M.phlei DEMP-01):**

Is ready to use. Do not dilute. Shake before to use.

- **Positive and negative controls:**

Positive and negative controls must be diluted as serum samples (6µl controls+114µl M.phlei diluent)

- **Preparation of the conjugate:**

Is ready to use. Do not dilute

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. In an empty predilution microplate dispense the following amounts of reagents:
Milk: add 60 µl of milk samples and 60 µl of M.phlei diluent.
Sera and controls: add 6 µl of controls and sera samples and 114 µl of M.phlei diluent. We recommend to run controls in duplicate wells Cover the plate and incubate **30 min ± 3 min at 22-26°C**.
3. Transfer 100 µl of mix to microplate MAP coated included in the kit. Cover and incubate the plate for **45 min ± 4min at 22-26°C**
4. Wash 3 times with washing solution following the described procedure.
5. Add 100µl of the ready to use conjugate to each well. Cover and incubate the plate for **30 min ± 3min at 22-26°C**.
6. Wash 3 times following the described procedure.
7. Add 100 µl of substrate solution, to each well. Shake softly and keep the plate for **15 min at 22-26°C** in a dark place.
8. Add 100 µl of stop solution to each well in the same order as the substrate was dispensed.
9. Read the OD of each well with a spectrophotometer at 450 nm in the following 5 minutes.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

B. Sample/positive Index Calculation (S/P %):

If you run samples in duplicate, OD values will be calculated for each sample as the arithmetic mean of both values.

To obtain S/P % of the sample:

$$S/P\% = \frac{(\text{OD Sample} - \text{OD Neg C})}{(\text{OD Pos C} - \text{OD Neg C})} \times 100$$

C. Validation of the test:

The test could be considered valid if:

1. OD_{450nm} Positive control ≥ 0.75
2. OD_{450nm} Negative control < 0.2

D. Interpretation of the results:

Milk:

- Sample with S/P % ≥ 30 will be considered as positive.
- Sample with S/P % ≤ 20 will be considered as negative.
- Sample with S/P % between both values will be considered doubtful.

Serum:

- Sample with S/P % ≥ 55 will be considered as positive.
- Sample with S/P % ≤ 45 will be considered as negative.
- Sample with S/P % between both values will be considered doubtful.

Desarrollado y fabricado en España por:
Developed and manufactured in Spain by:

Eurofins-INGENASA
Avda. de La Institución Libre de Enseñanza,
39
28037- MADRID (SPAIN)
Tlf: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es

Distributed in.....by:



IT-73840
IT-73780



ISO 14001

9191.INGE



ISO 9001:2015

9175.ING2