

Manuel du test *cattletype*[®] MAP Ab



5 (n° de référence 270803)



20 (n° de référence 270805)*

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

Enregistré conformément à l'article 17c de la loi
allemande sur les maladies animales (Flu-B 471)

REF

270803, 270805*



QIAGEN Leipzig GmbH, Deutscher Platz 5b, 04103 Leipzig,
Allemagne



* Disponible uniquement sur demande.

Technologies d'échantillonnage et de dosage QIAGEN

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillonnage et de dosage permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services avancés de haute qualité garantissent le succès, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines
- dosages d'acides nucléiques et de protéines
- recherche micro-ARN et ARNi
- automatisation des technologies d'échantillonnage et de dosage

Notre mission consiste à permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

De plus, QIAGEN fournit des solutions moléculaires simples d'utilisation, de haute qualité et d'une grande sensibilité permettant la détection des agents pathogènes animaux et la recherche sur ces agents pathogènes. La gamme de produits vétérinaires de QIAGEN comprend un vaste éventail de tests PCR spécifiques à la détection d'agents pathogènes et une large palette de tests ELISA. Pour plus d'informations, consulter le site www.qiagen.com/Animal-and-Veterinary-Testing.

Sommaire

Contenu du kit	4
Utilisation prévue	5
Symboles	5
Conservation	6
Informations de sécurité	6
Contrôle qualité	7
Introduction	7
Principe	8
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur	9
Précautions générales	10
Protocoles :	
■ Procédure de test ELISA pour les échantillons de sérum et de plasma	12
■ Procédure de test ELISA pour échantillons de lait	14
Interprétation des données	16
Critères de validation	16
Guide de dépannage	18
Pour commander	19
Guide rapide	21
Interprétation des données	22

Contenu du kit

<i>cattletype</i> MAP Ab		
N° de référence	270803	270805*
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 x 100 ml	1 x 400 ml
Negative Control (contrôle négatif), prêt à l'emploi	1 x 3,5 ml	2 x 3,5 ml
Positive Control (contrôle positif), prêt à l'emploi	1 x 3,5 ml	2 x 3,5 ml
Wash buffer (tampon de lavage) (10x)	3 x 125 ml	2 x 500 ml
Conjugate (conjugué), prêt à l'emploi	1 x 60 ml	1 x 240 ml
TMB Substrate (substrat TMB), prêt à l'emploi	1 x 60 ml	1 x 240 ml
Stop solution (solution d'arrêt), prête à l'emploi	1 x 60ml	1 x 240 ml
Handbook (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. Le kit est approuvé par le Friedrich-Loeffler-Institut et enregistré conformément à l'article 17c de la loi allemande sur les maladies animales (FluB 471) pour une utilisation en Allemagne à des fins de procédures diagnostiques en médecine vétérinaire. Réservé exclusivement à un usage vétérinaire.

Symboles



Contient des réactifs pour <N> tests



Fabricant autorisé



Numéro de lot



À utiliser avant le



Limites de température pour le stockage



Manuel



Numéro de référence



Numéro de matériel



Conserver à l'abri de la lumière



Pour les échantillons de bovins, moutons et chèvres

Conservation

Les composants du test ELISA *pigtype* MAP Ab 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. Le tampon de lavage (10x) et la solution d'arrêt peuvent être conservés à température ambiante (18 à 25 °C) pour éviter la cristallisation du sel. Si des bandelettes de test sont fournies avec le kit, conservez celles qui restent dans la poche en aluminium rescellée avec un absorbeur d'humidité, à une température comprise entre 2 et 8 °C jusqu'à la prochaine utilisation. Les bandelettes de test peuvent être conservées pendant au moins 6 semaines à compter de la date d'ouverture de la poche de la plaque.

Informations de sécurité

Lors de la manipulation des 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. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.



AVERTISSEMENT : la solution d'arrêt contient 0,5 M d'acide sulfurique.

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.

Informations d'urgence 24 heures sur 24

Aide d'urgence chimique et assistance en cas d'accident disponible 24 heures/24 auprès de :

CHEMTREC

Aux États-Unis et au Canada ■ Tél. : 1-800-424-9300

Dans les autres pays ■ Tél. : +1-703-527-3887

(appels à frais virés acceptés)

Contrôle qualité

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

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 diluant d'échantillon contenant un extrait de *Mycobacterium phlei* désactivé destiné à minimaliser 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 rinçage élimine le matériel non lié. Le conjugué anti-IgG-HRP détecte les anticorps liés à l'antigène. Le rinçage élimine le conjugué non lié. Une réaction colorimétrique est initiée par l'ajout de solution de substrat et arrêtée au bout de 10 minutes. En présence d'anticorps spécifiques à MAP dans l'échantillon, la peroxydase de raifort (HRP) catalyse un développement de couleur bleue qui devient jaune après l'ajout de solution d'arrêt. 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 des 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 (adaptables)
- Pipettes multicanaux (adaptables)
- Papier aluminium ou film adhésif pour couvrir la plaque de test
- Appareil de distribution et d'aspiration de solution de lavage (facultatif)
- Lecteur d'absorbance pour microplaques
- Tubes ou plaques pour diluer les échantillons
- Eau distillée

Précautions générales

L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants :

- Ne pas exposer la solution de substrat TMB à une lumière intense ou à la lumière 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.
- Si l'eau des systèmes d'échange d'ions utilisée pour diluer la solution de lavage (10x) n'est pas assez pure, elle peut interférer avec le test. La qualité de l'eau bidistillée ou hautement purifiée (Milli-Q) est adaptée.
- Pour des résultats de test précis, il est essentiel d'utiliser des dispositifs aux verres propres, de pipeter et de rincer soigneusement lors du test et de respecter strictement les temps d'incubation indiqués.

À effectuer avant de commencer

- Porter les réactifs à température ambiante (18 à 25 °C) immédiatement avant de les utiliser. En cas de cristaux de sel précipités dans le tampon de lavage (10x), dissoudre en mélangeant et en chauffant doucement.

Tampon de lavage : diluer le tampon de lavage (10x) 1:10 dans de l'eau distillée. Par exemple, pour une plaque de test, diluer 25 ml de tampon de lavage (10x) dans 225 ml d'eau distillée, puis mélanger.

Sérum/plasma : avant d'analyser les échantillons de sérum/ plasma, diluer **1:20** dans du diluant d'échantillon (p. ex. diluer un échantillon de 10 µl dans 190 µl de diluant d'échantillon) 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.

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 3 000 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 diluant d'échantillon, par exemple, diluer 70 µl d'échantillon dans 70 µl de diluant d'échantillon et bien mélanger. Changer les pointes de pipette pour chaque échantillon.

- Les **contrôles** sont prêts à l'emploi et ne nécessitent pas de dilution.

Protocole 1 : procédure de test ELISA pour les échantillons de sérum et de plasma

Lire attentivement « À effectuer avant de commencer », page 10.

Procédure

- 1. Pré-incuber pendant 1 à 2 heures à température ambiante ou jusqu'au lendemain (12 à 18 h) 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 contrôle négatif (en double) et de contrôle positif (en double) dans les puits appropriés.**
- 3. Pipeter 100 µl de l'échantillon pré-incubé dans les puits restants, puis mélanger.**

Enregistrer les positions des contrôles et des échantillons dans un protocole de test. L'utilisation de pipettes multi-canaux est recommandée pour le transfert des échantillons. Couvrir la plaque de test.

- 4. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (18 à 25 °C).**
- 5. Retirer la solution des puits en aspirant ou en tapotant.**
- 6. Rincer chaque puits 3 fois avec 300 µl de tampon de lavage préparé. Retirer le tampon après chaque rinçage.**
- 7. Pipeter 100 µl de conjugué 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 en aspirant ou en tapotant.**
- 9. Rincer chaque puits 3 fois avec 300 µl de tampon de lavage préparé. Retirer le tampon après chaque rinçage.**

- 10. Pipeter 100 μ l de solution de substrat TMB dans chaque puits.**
- 11. Incuber à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 10 minutes, à compter du remplissage du premier puits.**
- 12. Arrêter la réaction en ajoutant 100 μ l de solution d'arrêt par puits. Ajouter la solution d'arrêt en suivant le même ordre que pour la solution de substrat.**
- 13. Mesurer la densité optique (DO) dans le lecteur de plaque à 450 nm pendant 20 minutes après avoir arrêté la réaction.**
La mesure à une longueur d'ondes de référence (620 à 650 nm) est facultative.

Protocole 2 : procédure de test ELISA pour échantillons de lait

Lire attentivement « À effectuer avant de commencer », page 10.

Procédure

- 1. Pré-incuber les échantillons dilués pendant 1 à 2 heures à température ambiante.**
Fermer les tubes en plastique et couvrir la plaque de pré-incubation (avec un couvercle ou un film adhésif).
- 2. Pipeter 50 µl de diluant d'échantillon dans 4 puits de la plaque de test. Pipeter 50 µl de contrôle négatif et positif dans les puits pré-déterminés en double, puis bien mélanger.**
- 3. Pipeter 100 µl des échantillons de lait pré-incubés dans les puits de la plaque de test.**
Enregistrer les positions des contrôles et des échantillons dans un protocole de test. L'utilisation de pipettes multi-canaux est recommandée pour le transfert des échantillons. Couvrir la plaque de test
- 4. Incuber jusqu'au lendemain entre 2 et 8 °C.**
- 5. Retirer la solution des puits en aspirant ou en tapotant.**
- 6. Rincer chaque puits 3 fois avec 300 µl de tampon de lavage préparé. Retirer le tampon après chaque rinçage.**
- 7. Pipeter 100 µl de conjugué prêt à l'emploi dans chaque puits et incubé pendant 30 minutes à température ambiante (18 à 25 °C).**
- 8. Retirer la solution des puits en aspirant ou en tapotant.**
- 9. Rincer chaque puits 3 fois avec 300 µl de tampon de lavage préparé. Retirer le tampon après chaque rinçage.**

10. Pipeter 100 μ l de solution de substrat TMB dans chaque puits.
11. Incuber à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 10 minutes, à compter du remplissage du premier puits.
12. Arrêter la réaction en ajoutant 100 μ l de solution d'arrêt par puits. Ajouter la solution d'arrêt en suivant le même ordre que pour la solution de substrat.
13. Mesurer la densité optique (DO) dans le lecteur de plaque à 450 nm pendant 20 minutes après avoir arrêté la réaction. La mesure à une longueur d'ondes de référence (620 à 650 nm) est facultative.

Interprétation des données

Critères de validation

Les résultats sont valides si les critères suivants sont remplis :

- La valeur moyenne (VM) de la valeur de densité optique mesurée pour le contrôle positif (PC) doit être $\geq 0,7$
- La valeur moyenne (VM) de la valeur de densité optique mesurée pour le contrôle négatif (NC) doit être $\leq 0,2$

En cas de tests invalides, les tests doivent être répétés après une révision rigoureuse des instructions d'utilisation.

Calcul

Calculer les valeurs moyennes (VM) de la DO mesurée pour le contrôle négatif (NC) et le contrôle positif (PC).

Le ratio (S/P) de la DO échantillon sur la DO moyenne du contrôle positif est calculé selon l'équation suivante :

$$S/P = \frac{DO_{\text{échantillon}} - VM_{DO_{NC}}}{VM_{DO_{PC}} - VM_{DO_{NC}}}$$

Interprétation des données pour le sérum et le plasma

Les échantillons dont le ratio S/P est $< 0,4$ sont négatifs.

Les anticorps spécifiques à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* n'ont pas pu être détectés.

Les échantillons dont le ratio S/P est $\geq 0,4$ sont positifs.

Les anticorps spécifiques à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ont été détectés.

Interprétation des données pour le lait

Les échantillons dont le ratio S/P est $< 0,6$ sont négatifs.

Les anticorps spécifiques à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* n'ont pas pu être détectés.

Les échantillons dont le ratio S/P est $\geq 0,6$ sont positifs.

Les anticorps spécifiques à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ont été détectés.

Guide de dépannage

Les techniciens de QIAGEN sont toujours heureux de répondre aux questions concernant les informations et/ou les protocoles contenus dans ce manuel ou à propos des technologies d'échantillonnage et de dosage (pour les coordonnées, voir la quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>cattletype</i> MAP Ab (5)	Pour 480 réactions : 5 plaques de tests (barrettes), solution de lavage, diluant d'échantillon, contrôle positif, contrôle négatif, conjugué, solution de substrat TMB, solution d'arrêt	270803
<i>cattletype</i> MAP Ab (20)*	Pour 1 920 réactions : 20 plaques de tests (solides), solution de lavage, diluant d'échantillon, contrôle positif, contrôle négatif, conjugué, solution de substrat TMB, solution d'arrêt	270805
Produits connexes		
<i>cattletype</i> BHV1 gB Ab (5)†	Pour 480 réactions : 5 plaques de tests (barrettes), solution de lavage, diluant d'échantillon, contrôle positif, contrôle négatif, conjugué, solution de substrat TMB, solution d'arrêt	270043
<i>cattletype</i> Milk Prep Kit (50)	Réactif de précipitation, tampon de neutralisation, matrice, tampon d'éluion, filtres amovibles, tubes de prélèvement	271906

* Disponible uniquement sur demande.

† Autres tailles de kit disponibles ; consulter www.qiagen.com.

QIAGEN offre une gamme de kits ELISA et de kits PCR et RT-PCR en temps réel pour la détection des agents pathogènes d'animaux. Consulter le site www.qiagen.com/Animal-and-Veterinary-Testing pour obtenir de plus amples renseignements sur les produits *bactotype*[®], *cador*[®], *cattletype*, *flocktype*[®], *pigtype*[®] et *virotype*[®].

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Guide rapide

Dilution d'échantillon :

Sérum/plasma 1:20

Lait 1:2

Étape	Sérum/plasma	Lait
1. Pré-incubation	1 à 2 h à temp. amb. ou jusqu'au lendemain entre 2 et 8° C	1 à 2 h à temp. amb.
2. Transfert	100 µl/puits	
3. Incubation	30 min à temp. amb.	Jusqu'au lendemain entre 2 et 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	Positif
Sérum/plasma	S/P < 0,4	S/P ≥ 0,4
Lait	S/P < 0,6	S/P ≥ 0,6

Marques déposées : QIAGEN®, *bactotype*®, *cattletype*®, *flocktype*®, *pigtype*®, *virotype*® (groupe QIAGEN). Les noms déposés, marques déposées etc. utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement indiqués comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

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. QIAGEN 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.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu 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, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les 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. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir www.qiagen.com.

© 2013 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

