

ADIAVET™ BVDV REAL TIME

PRUEBA PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA
MEDIANTE AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA EN TIEMPO REAL (PRUEBA RT-PCR)

Referencias:

ADI105-100 (100 reacciones)

ADI105-500 (500 reacciones)



ADIAVET™ BVDV REAL TIME

I.	HISTORIAL DE REVISIONES	3
II.	INFORMACION GENERAL.....	4
1.	Objetivo del ensayo.....	4
2.	Agente patógeno	4
3.	Descripción y principio de la prueba	4
III.	MATERIAL Y REACTIVOS	6
1.	Reactivos suministrados en el kit	6
2.	Validez y conservación	6
3.	Uso del "BVDV CTL+"	6
4.	Material necesario, pero no suministrado en el kit	6
IV.	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y LOS CONTROLES	8
1.	Precauciones	8
2.	Almacenamiento de muestras y extractos de ARN	8
3.	Preparación de las muestras.....	8
4.	Controles a incluir	9
V.	EXTRACCION Y PURIFICACION	10
1.	Con el kit ADIAMAG.....	10
2.	Con el kit ADIAPURE™ TLB (extracción de ARN a partir de cartílagos auriculares sin purificación)	10
3.	Con el kit NucleoSpin® RNA Virus.....	10
4.	Con el kit QIAamp® Viral RNA.....	12
5.	Con el kit NucleoSpin® 96 Virus.....	13
6.	Con el kit RNeasy®	14
VI.	AMPLIFICACION	16
VII.	INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.....	17
1.	Definiciones.....	17
2.	Validación e interpretación de los resultados.....	17
VIII.	ÍNDICE DE SIMBOLOS.....	20

I. Historial de revisiones

N/A	No aplica (primera versión)
Corrección	Corrección de las anomalías del documento
Modificación técnica	Adición, revisión o eliminación de información sobre el producto
Administrativo	Modificaciones no técnicas, perceptibles por el usuario

Nota: Las modificaciones menores de tipografía, gramática y maquetación no aparecen en el historial de revisiones.

Fecha de la edición	Referencia	Tipo de revisión	Revisión realizada
2022-03	NS105-01	Modificación técnica	primera versión

II. Información general

1. Objetivo del ensayo

El kit ADIAVET™ BVDV REAL TIME detecta el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF), mediante amplificación enzimática (PCR) en tiempo real, a partir de muestras de sangre total, muestras de suero y tejidos de bovinos, ovinos, caprinos y ciervos salvajes, a partir de biopsias auriculares de bovinos (secas, húmedas y líquidas), y también a partir de muestras de leche de bovinos, ovinos y caprinos.

2. Agente patógeno

Los pestivirus presentan como material genético un ARN de cadena simple de sentido positivo. Los pestivirus pertenecen a la familia *Flaviviridae*, como el virus de la hepatitis C, e incluyen el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) en los ovinos, y la peste porcina clásica (PPC). El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) provoca la enfermedad de las mucosas en el ganado vacuno y provoca importantes pérdidas económicas en las explotaciones.

Muchos países han puesto en marcha planes para erradicar la enfermedad, los cuales implican una gestión cuidadosa de los animales infectados, que deben ser detectados con gran precocidad y fiabilidad. La infección prenatal de un ternero entre el día 60 y el día 120 de gestación conduce al nacimiento de un animal permanentemente infectado inmunotolerante (IPI). Estos animales contagiosos son seronegativos durante toda su vida y virológicamente positivos. La detección del virus por antigenemia solo es posible varias semanas después del nacimiento, debido a la persistencia de los anticuerpos colostrales. Por lo tanto, la detección temprana de estos animales IPI es esencial en los planes de erradicación.

Desde el descubrimiento de la amplificación *in vitro* del ADN en 1985 (PCR), muchos equipos de investigación han desarrollado pruebas para la detección del virus mediante la amplificación génica de su ARN genómico o RT-PCR. La mayoría de estas pruebas detectan pequeñas cantidades del virus de la DVB en la sangre o en los órganos de los animales infectados, incluso en aquellos menores de tres meses.

3. Descripción y principio de la prueba

Este test está basado en la transcripción inversa (TI) del ARN del virus en ADN complementario, que después se amplifica mediante PCR gracias a una ADN polimerasa usando cebadores específicos. Las dos reacciones enzimáticas se producen en el mismo tubo (One-step RT-PCR). Los productos amplificados se detectan en tiempo real mediante el marcado específico con sondas de hidrólisis (tecnología 5'-exonucleasa).

El kit ADIAVET™ BVDV REAL TIME puede detectar de forma simultánea

- los virus de la DVB, VEF y algunos virus de la PPC (sonda marcada con FAM)
- la RNasa P como control interno de extracción y de amplificación específica de ARN endógeno (sonda marcada con un fluorocromo leído en el mismo espectro que VIC o HEX).

Bio-X Diagnostics ha validado esta prueba con diferentes kits de purificación de ARN (Bio-X Diagnostics, Qiagen y Macherey-Nagel). Se pueden utilizar otros kits de purificación si han sido validados por el usuario.

Tipos de muestras y opciones de análisis correspondientes:

Muestra	Análisis individual	Análisis en mezcla*, posible hasta
Sangre entera	☒	50
Suero	☒	50
Tejidos (placenta, bazo, tejido fetal, etc.)	☒	☒
Biopsia auricular**	☒	25
Leche	☒	Depósito

* Para los laboratorios que realizan análisis en el marco de una calificación de animales no IPI (por ejemplo, la certificación ACERSA). Los laboratorios nacionales de referencia (LNR) autorizan un tamaño para las mezclas y unas técnicas de extracción específicas. Cumplen con la legislación vigente en su país u organismo de certificación.

** El ARN de los tejidos de las biopsias auriculares puede extraerse con el kit ADIAPURE™ TLB (Bio-X Diagnostics, ref. ADIADP10E1-400).

III. Material y reactivos

1. Reactivos suministrados en el kit

REF ADI105-100

A5	solución de amplificación	2 tubos con tapón verde de 1000 µl (reactivo listo para usar)
BVDV CTL+	control positivo virus de la BVD	1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
NF-Water	Agua sin nucleasas	1 tubo con tapón blanco de 1000 µl (reactivo listo para usar)

REF ADI105-500

A5	solución de amplificación	10 tubos con tapón verde de 1000 µl (reactivo listo para usar)
BVDV CTL+	control positivo virus de la BVD	2 tubos con tapón violeta (para reconstituir)
NF-Water	Agua sin nucleasas	1 tubo con tapón blanco de 1000 µl (reactivo listo para usar)

2. Validez y conservación

Tras su recepción, el kit se debe conservar a **< -15 °C**.

Se recomienda alicuotar el reactivo "A5" si el número de análisis a realizar requiere más de tres descongelaciones.

No descongelar más de 3 veces.

Los reactivos en tiempo real son sensibles a la luz: manténgalos en un lugar oscuro.

El reactivo "A5" está listo para utilizarse en la reacción PCR.

No mezclar reactivos de diferentes lotes.

3. Uso del "BVDV CTL+"

"BVDV CTL+" es un control positivo para la amplificación.

Añadir **200 µl** de "NF-Water" al "BVDV CTL+" (**recomendado**) y agitar en vórtex durante al menos 20 segundos.

Alicuotar esta solución en 6 o 12 µl y almacenar a **<-15 °C**.

Para cada prueba, utilizar 5 µl de "BVDV CTL+" en uno de los pocillos.

4. Material necesario, pero no suministrado en el kit

Nota: el consumible utilizado no debe contener nucleasas (por ejemplo, pasado dos veces durante 25 minutos por el autoclave a +120 °C o una vez durante 60 minutos a +121 °C)

Reciclador térmico con su consumible para PCR en tiempo real: tubos PCR de 0,2 ml o placas PCR de 96 pocillos cerrados de calidad óptica

- Estación de seguridad microbiológica de tipo II
- Centrifugadora para microtubos, tubos de 15 ml, placa de 96 pocillos
- Molino mezclador (Mixer Mill, Fast Prep o Rylolyser)
- Horno, baño maría o bloque calefactor
- Dispositivo de homogeneización para tubos
- Pipetas de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl y 200 - 1000 µl
- Conectores sin nucleasas con filtros para micropipetas
- Microtubos sin nucleasas de 1,5 ml y 2 ml
- Tubos estériles de 5, 10 o 15 ml
- Guantes de látex o nitrilo sin polvo
- Esferas metálicas (tungsteno o acero inoxidable) 3 mm
- Cuchillas de escalpelo
- Etanol al 96 - 100 %
- Etanol al 70 %
- β-mercaptoetanol 14,5 M

- Materiales necesarios según el protocolo de extracción

			Sangre con EDTA	Sangre con anticoagulante (heparina, citrato)	Suero	Leche	Tejidos (ganglio linfático, mucosa oral, bazo, etc.)	Biopsias auriculares secas	Biopsias auriculares húmedas	Biopsias auriculares líquidas
			Tamaño máximo del grupo de muestras							
Referencias de los kits de extracción		Referencias adicionales	50	50	50	Depósito	1	25	25	25
ADIAMAG Esferas magnéticas ARN/ADN	Bio-X Diagnostics: 200 extracciones: ref. NADI003 o 800 extracciones: ref. NADI003-XL	-Tampón de lisis LB3 (para mezclas de cartílago auricular): Bio-X Diagnostics: ref. NADI004	+		+	+	+	+	+	+
Sin purificación de ARN: ADIAPURE™ TLB	Bio-X Diagnostics, ref. ADIADP10E1-400							+	+	
QIAamp® Viral RNA	Qiagen, 50 extracciones: ref. 52904 o 250 extracciones: ref. 52906		+		+	+	+	+		
NucleoSpin® RNA Virus	Macherey-Nagel, 50 extracciones: ref. 740956.50 o 250 extracciones: ref. 740956.250	- Tampón RL1 (opcional, para el cartílago auricular): Macherey-Nagel, 50 ml: ref. 740385.50 o BioX Diagnostics ref. 740385	+		+	+		+		
Nucleospin® 96 Virus	Macherey-Nagel, 2 x 96 extracciones: ref. 740691.2 o 4 x 96 extracciones: ref. 740691.4	- MN Square-well Block: Macherey-Nagel, 4 placas: ref. 740476	+		+					
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, 50 extracciones: ref. 74104 o 250 extracciones: ref. 74106	-Tampón EL: Qiagen: ref. 79217 (para sangre con anticoagulante)	+	+	+	+	+	+		

Para los laboratorios que realizan análisis en el marco de una cualificación de animales no IPI (ejemplo: garantía ACERSA en Francia).
 Los laboratorios nacionales de referencia (LNR) autorizan un tamaño específico para las mezclas y unas técnicas de extracción específicas. Cumplir con la legislación vigente en su país o con el organismo de certificación.

IV. Tratamiento de las muestras y los controles

Antes de comenzar la prueba, lea todo el protocolo y sígalo cuidadosamente.

1. Precauciones

Adiagène ha validado esta prueba con los kits de extracción de ARN de Qiagen, Macherey-Nagel y Bio-X Diagnostics. Se pueden utilizar otros kits de extracción una vez que se hayan validado.

Respetar las recomendaciones de los fabricantes para la conservación, la preparación y la utilización de los reactivos contenidos en los kits de extracción.

Algunos kits contienen o necesitan la utilización de compuestos tóxicos. Estos productos deben ser manipulados con guantes y bajo campana química.

Recomendamos encarecidamente que este ensayo sea realizado únicamente por personal cualificado. Comprobar la exactitud y precisión de las micropipetas utilizadas. La calidad de los resultados depende del respeto escrupuloso de las buenas prácticas de laboratorio.

La PCR produce grandes cantidades de ADN amplificado. Algunas moléculas de estos productos amplificados pueden producir un resultado positivo. Así pues, es importante separar la zona de manipulación de las muestras que van a ser examinadas de la zona de análisis de los productos amplificados. No se deben abrir los tubos de PCR tras la amplificación.

Las muestras para el análisis deberán ser manipuladas y destruidas como material biológico. **Tome todas las medidas de seguridad y confinamiento necesarias para la manipulación de los agentes biológicos en cuestión.**

Le recomendamos que haga alicuotas de agua desmineralizada, las esterilice en autoclave (dos veces durante 25 minutos a +120 °C o una vez durante 60 minutos a +121 °C) y cambie el tubo de agua durante cada manipulación para evitar la contaminación.

2. Almacenamiento de muestras y extractos de ARN

Las muestras pueden almacenarse durante uno o dos días a +2/8 °C. Después de 2 días, es aconsejable almacenarlos a <-15 °C. A **excepción** de la **sangre** con anticoagulante que no debe ser congelada y el **cartílago auricular** que debe ser almacenado a <-15 °C tras su recepción.

Los ARN extraídos son moléculas sensibles. Los lisados pueden almacenarse inmediatamente después de la extracción en hielo o a +2/8 °C durante unas horas, y luego deben conservarse a <-15 °C.

3. Preparación de las muestras

Caso especial para los crotales de muestreo ALLFLEX TST-L :

En el caso particular de un crotal ALLFLEX TST-L que contiene un tampón de conservación, se pueden utilizar 2 matrices:

- BAH (biopsia auricular húmeda): biopsia sin tampón de conservación. En este caso, retirar el tampón de conservación del tubo de recogida, antes o después de la expulsión de la biopsia. Para la extracción, utilizar la biopsia como matriz.
- BAL (biopsia auricular líquida): tampón de conservación en el que se incubó la biopsia. En este caso, introducir la biopsia en el tampón de conservación y, en caso necesario, ajustar el volumen a 250 µl con el tampón de conservación ALLFLEX e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la extracción, utilizar el tampón como matriz.

Ver § V para la extracción y purificación del ARN.

4. Controles a incluir

Se deben incluir varios controles en cada serie de extracción.

El control interno endógeno (RNasaP), presente de forma natural en las células del animal, se utiliza para verificar la extracción y amplificación de cada muestra. El control "BVDV CTL+" valida la amplificación de la cepa diana.

La combinación de estos diferentes controles permite la validación de todas las etapas del proceso analítico (extracción+amplificación), sean cuales sean las matrices.

Deben o pueden añadirse otros controles:

- **Control de extracción negativo (obligatorio)**

Para garantizar la ausencia de contaminación cruzada, debe incluirse al menos un control negativo en cada serie de extracción (por ejemplo, la norma U47 600 recomienda un control negativo de proceso analítico por cada centrífuga de 24 columnas, o 4 controles negativos de proceso analítico por placa de 96 pocillos). Este control puede realizarse con una matriz negativa o con un tampón de dilución.

- **Control positivo "diana" de extracción (recomendado)**

Se puede introducir un control "diana" positivo por cada serie de extracción. Esta es una muestra que contiene el virus VDVB. Puede obtenerse a partir de una muestra positiva disponible en el laboratorio, o de una muestra negativa enriquecida con una solución del virus de la DVB. Este control positivo diana, a veces llamado centinela, permite establecer un seguimiento en forma de tarjeta de control, que proporciona información sobre la fiabilidad de los resultados obtenidos.

ADIAGENE puede proporcionar un control positivo de objetivo de extracción que consiste en un cultivo viral inactivado y liofilizado, calibrado entre 1 y 100 x LD_{método}. (ADIAVET™ BVDV Extraction Positive Control ref. ADI105-8).

Este control, añadido a una matriz negativa (sangre o suero), puede utilizarse como **centinela**.

V. Extracción y purificación

1. Con el kit ADIAMAG

Consulte la versión de las instrucciones NFKF disponibles en el sitio web indicado en el certificado de análisis incluido en el kit ADIAVET™ utilizado.

2. Con el kit ADIAPURE™ TLB (extracción de ARN a partir de cartílagos auriculares sin purificación)

Consultar la versión de las instrucciones disponibles en la página web indicada en el certificado de análisis incluido en el kit ADIAPURE™ TLB utilizado.

3. Con el kit NucleoSpin® RNA Virus

A. Preparación de las muestras

Es posible la detección en grupos de muestras. Consultar la tabla de la página 6 para conocer el tamaño máximo del grupo para cada tipo de muestra.

a) A partir de sangre con EDTA

Recoger **100 µl** de sangre o de mezcla de sangres en un microtubo.
Continuar siguiendo la tabla que se muestra a continuación.

b) A partir de suero

Recoger **140 µl** de suero o mezcla de sueros en un microtubo.
Continuar siguiendo la tabla que se muestra a continuación.

c) A partir de leche

Recoger **6 ml** de leche o mezcla de leches en un tubo de 15 ml.
Centrifugar durante 15 minutos a 3500 g a +2/8 °C.
Retirar la crema y el lactosuero con una espátula.
NB: el sedimento puede almacenarse a < -15 °C hasta la extracción.
Continuar siguiendo la tabla que se muestra a continuación.

d) A partir de cartílago auricular

Cualquiera de las siguientes opciones puede utilizarse para la extracción de ARN del cartílago auricular.

Posibilidad nº1

Extraer el cartílago auricular en el tubo de recogida con código de barras del crotal auricular.
Continuar siguiendo la tabla que se muestra a continuación.

Posibilidad nº2

Extraer el cartílago auricular en el tubo de recogida con código de barras del crotal auricular.
Añadir **350 µl** de **tampón RL1**.

Homogeneizar.

Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Transferir **100 µl** del sobrenadante a un microtubo.

NB1: se pueden hacer grupos de hasta 25, mezclando, por ejemplo, 50 µl de cada solución obtenida individualmente. Homogeneizar y luego recoger 100 µl de la mezcla en un microtubo.

NB2: con la posibilidad Nº 2, cada solución obtenida individualmente puede almacenarse a temperatura ambiente o a +2/8 °C para un análisis posterior, durante 24 horas. Después de 24 horas, almacenar a < 15 °C.

Continuar siguiendo la tabla que se muestra a continuación.

B. Extracción

Todas las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente.

	Cartílagos auriculares Posibilidad nº1	Cartílagos auriculares Posibilidad nº2	Sangre con EDTA	Suero	Leche
Muestra preparada	1 cartílago auricular	100 µl de sobrenadante	100 µl	140 µl	Sedimento celular
Lisis	Añadir 350 µl de tampón RAV1 + ARN transportador	Añadir 560 µl de tampón RAV1 + ARN transportador			
	Mezclar durante 15 segundos e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. ¹ Transferir 100 µl del sobrenadante o de la mezcla ² a un microtubo.	Homogeneizar durante 15 segundos e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.			Homogeneizar durante 15 segundos hasta la resuspensión del sedimento.
Preparación de la fijación	Añadir 560 µl de etanol al 100 % . Mezclar por flujo y reflujo con una pipeta (~10 veces) o con un mezclador de tipo vortex (~15 segundos).				
Transferencia a las columnas y fijación a la membrana	Identificar las columnas, colocar 630 µl de mezcla en la columna correspondiente. Centrifugar 1 minuto a 10 000 g. Depositar el volumen restante en la columna y centrifugar 1 minuto a 10 000 g.				
1 ^{er} lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 500 µl de tampón RAW . Centrifugar 1 minuto a 10 000 g.				
2 ^o lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 500 µl de tampón RAV3 . Centrifugar 1 minuto a 10 000 g.				
Secado de la columna	Cambiar el tubo collector. Centrifugar 3 minutos a 10 000 g.				
Elución	Tranferir la columna a un microtubo. Depositar 60 µl de agua sin nucleasas (NF-Water) . Incubar ~1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a 10 000 g.				
Conservación	Cerrar los tubos, identificarlos y conservarlos en hielo si se van a usar inmediatamente, o a < -15 °C.				

¹En caso de un nuevo análisis, cada solución individual obtenida debe almacenarse **rápidamente** a < -15 °C. Si se va a reutilizar la solución individual, descongelar y almacenar inmediatamente a < -15 °C después de la recogida.

²Se pueden hacer grupos de hasta 25 mezclando, por ejemplo, **50 µl** de cada solución obtenida individualmente. Homogeneizar.

4. Con el kit QIAamp® Viral RNA

Es posible la detección en grupos de muestras. Consultar la tabla de la página 6 para conocer el tamaño máximo del grupo para cada tipo de muestra.

Todas las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente.

	Sangre con EDTA	Suero	Órgano	Leche	Cartílago auricular
Muestra preparada en un microtubo	100 µl	140 µl	0,1 g	100 µl	1 cartílago auricular
Lisis	Añadir 560 µl de tampón AVL + ARN transportador.				Añadir 350 µl de tampón AVL + ARN transportador.
	Homogeneizar 15 segundos e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.	Triturar. ¹ Centrifugar 2 minutos a 6000 g. Transferir el sobrenadante a un microtubo.	Homogeneizar durante 15 segundos hasta la resuspensión del sedimento.	Homogeneizar 15 segundos e incubar 10 minutos a temperatura ambiente. ² Transferir 100 µl de sobrenadante o de la mexcla ³ a un microtubo.	
Preparación de la fijación	Añadir 560 µl de etanol al 100 %. Mezclar por flujo y reflujo con una pipeta (~10 veces) o con un mezclador de tipo vortex (~15 segundos).				
Transferencia a las columnas y fijación a la membrana	Identificar las columnas, verter 630 µl de la solución obtenida en la columna correspondiente. Centrifugar 1 minuto a 10 000 g. Depositar el volumen restante en la columna y centrifugar 1 minuto a 10 000 g.				
1er lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 500 µl de tampón AW1 a la columna. Centrifugar 1 minuto a 10 000 g.				
2º lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 500 µl de tampón AW2. Centrifugar 1 minuto a 10 000 g.				
Secado de la columna	Cambiar el tubo colector. Centrifugar 3 minutos a 10 000 g.				
Elución	Tranferir la columna a un microtubo. Depositar 60 µl de tampón AVE. Incubar ~1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a 10 000 g.				
Conservación	Cerrar los tubos, identificarlos y conservarlos en hielo si se van a usar inmediatamente, o a < -15 °C.				

¹ Por ejemplo, utilizando un molino mezclador (p.e. Mixer Mill): añadir 1 esfera metálica (3 mm), triturar durante 2 minutos a 30 Hz.

² En caso de un nuevo análisis, cada solución individual obtenida debe almacenarse **rápidamente** a < -15°C. Si se va a reutilizar la solución individual, descongelar y almacenar inmediatamente después de la recogida a < -15 °C.

³ Se pueden hacer grupos de hasta 25 mezclando, por ejemplo, **50 µl** de cada solución obtenida individualmente. Homogeneizar.

5. Con el kit NucleoSpin® 96 Virus

Es posible la detección en grupos de muestras. Consultar la tabla de la página 6 para conocer el tamaño máximo del grupo para cada tipo de muestra.

En cada kit se suministran tres placas de pocillos cuadrados MN, que sirven como placa de mezcla y de recuperación. Una vez utilizadas, se pueden vaciar, descontaminar con HCl 0,4 M durante 1 minuto, lavar con agua destilada y esterilizar usando el autoclave.

La placa de 96 pocillos (tipo Elisa) no está incluida en el kit.

Las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente a 5900 rpm (5600-5800 g).

Antes de iniciar la extracción, precalentar:

- el tampón RAV1 + ARN transportador a +56 °C.
- agua sin nucleasas a +70 °C.

	Sangre en EDTA	Suero
Muestra preparada	Colocar 100 µl de sangre o de mezcla de sangre por pocillo de una placa Round-well Block.	Colocar 140 µl de suero o de mezcla de suero por pocillo de una placa Round-well Block.
Lisis	Añadir 560 µl de tampón RAV1 + ARN transportador precalentado a +56 °C + 20 µl de proteinasa K. Sellar la placa con una lámina de PE autoadhesiva. Agitar ~15 segundos con un agitador de placas de 96 pocillos. Incubar 10 minutos a +70 °C. Centrifugar durante unos segundos para eliminar las gotas de condensación.	
Preparación de la fijación	Dispensar 560 µl de etanol al 100 % en una placa Block de pocillos cuadrados MN. Retirar con cuidado la película adhesiva de la placa Round-well Block, que contiene la muestra y transferir toda la mezcla a la placa que contiene el etanol. Homogeneizar la mezcla por aspiración-retirada 5 veces (muy importante) con una pipeta multicanal P1000.	
Transferencia a las columnas y fijación a la membrana	Colocar una placa Nucleospin® Virus Binding Plate (azul) en una nueva placa MN Square-well Block. Dispensar toda la mezcla con una pipeta multicanal P1000 en la placa Nucleospin® Virus Binding Plate. Colocar una nueva lámina de PE autoadhesiva en la placa. Centrifugar 2 minutos. Si no ha pasado toda la mezcla, centrifugar durante otros 3 minutos.	
1º lavado	Colocar la placa Nucleospin® Virus Binding Plate en una nueva placa de bloque de pocillos cuadrados MN. Retirar la película adhesiva de la placa de unión a virus Nucleospin® Añadir 500 µl de tampón RAW a cada pocillo. Colocar una nueva lámina de PE autoadhesiva en la placa. Centrifugar 2 minutos.	
2º lavado	Retirar la película adhesiva de la placa Nucleospin® Virus Binding Plate. Añadir 900 µl de tampón RAV3 a cada pocillo. Colocar una nueva lámina de PE autoadhesiva sobre la placa. Centrifugar 5 minutos.	
Secado de la columna	Colocar la placa Nucleospin® Virus Binding Plate sobre una placa de 96 pocillos vacía y seca (tipo ELISA). Centrifugar 10 minutos.	
Elución	Colocar la placa Nucleospin® Virus Binding Plate en una gradilla con tiras de tubos MN. Retirar la película adhesiva de la placa. Añadir 100 µl de agua sin nucleasas precalentada a +70 °C a cada pocillo de la placa Nucleospin® Virus Binding Plate. <u>No utilizar el tampón RE.</u> Centrifugar 2 minutos.	
Conservación	Retirar la placa Nucleospin® Virus Binding Plate. Cerrar la placa Rack con MN Tube Strips con Caps for Strips. Conservar en hielo si se utiliza inmediatamente o a < -15 °C.	

6. Con el kit RNeasy®

A. Preparación de las muestras

Es posible la detección en grupos de muestras. Consultar la tabla de la página 6 para conocer el tamaño máximo del grupo para cada tipo de muestra.

a) A partir de sangre con anticoagulante (heparina, citrato, EDTA)

Pipetear **0,5 ml** de sangre o mezcla de sangre en un tubo de 15 ml.

Añadir **2,5 ml** de **tampón EL** y agitar para homogeneizar.

Colocar los tubos en hielo en proceso de fusión durante 15 minutos (homogeneizar dos veces durante este paso).

Centrifugar durante 10 minutos a 1000 g a +2/8 °C. Descartar el sobrenadante.

Añadir **2 ml** de **tampón EL** al sedimento y homogeneizar para resuspender.

Centrifugar durante 10 minutos a 1000 g a +2/8 °C. Descartar el sobrenadante.

NB: el sedimento puede almacenarse a < -15 °C hasta la extracción.

Continuar siguiendo la tabla que se muestra a continuación.

b) A partir de suero no centrifugado y no congelado

Recoger **1 ml** de suero o mezcla de sueros en un microtubo.

Centrifugar durante 10 minutos a 3000 g a +2/8 °C.

Eliminar el sobrenadante.

Continuar siguiendo la tabla que se muestra a continuación.

c) A partir de leche

Recoger **6 ml** de leche o mezcla de leches en un tubo de 15 ml.

Centrifugar durante 15 minutos a 3500 g a +2/8 °C.

Retirar la crema y el lactosuero con una espátula.

NB: el sedimento puede almacenarse a < -15 °C hasta la extracción.

Continuar siguiendo la tabla que se muestra a continuación.

d) A partir de órganos (pulmón, bazo, ganglio linfático, mucosa bucal...)

Transferir **0,1 g** de muestra lacerada a un microtubo.

Continuar siguiendo la tabla que se muestra a continuación.

e) A partir de cartílago auricular

Extraer el cartílago auricular en el tubo de recogida con código de barras del crotal auricular.

Continuar siguiendo la tabla que se muestra a continuación.

B. Extracción

Todas las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente.

	Sangre con anticoagulante (heparina, citrato, EDTA) Suero Leche	Órganos (pulmón, bazo, ganglio linfático, mucosa bucal...)	Cartílago auricular
Muestra preparada	Sedimento celular	0,1 g de órgano lacerado	1 cartílago auricular
Lisis	Añadir 350 µl de tampón RLT + β-Mercaptoetanol a 10 µl/ml.		Añadir 350 µl de tampón RLT.
	Homogeneizar durante 15 segundos hasta la resuspensión del sedimento.	Homogeneizar e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.	Homogeneizar e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. ¹ Transferir 100 µl del sobrenadante o de la mezcla ² al microtubo.
Preparación de la fijación	Añadir 350 µl de etanol al 70 %. Mezclar por flujo y reflujo con una pipeta al menos 10 veces o con un mezclador de tipo vortex durante 15 segundos.		
Transferencia a las columnas y fijación a la membrana	Identificar las columnas, verter 700 µl de la solución obtenida en la columna correspondiente. Centrifugar 1 minuto a 10 000 g.		
1 ^{er} lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 700 µl de tampón RW1 a la columna. Centrifugar 1 minuto a 10 000 g.		
2 ^o lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 500 µl de tampón RPE. Centrifugar 1 minuto a 10 000 g.		
Secado de la columna	Cambiar el tubo colector. Centrifugar 3 minutos a 10 000 g.		
Elución	Transferir la columna a un microtubo. Depositar 60 µl de agua sin nucleasas (NF-Water). Incubar ~2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a 10 000 g.		
Conservación	Cerrar los tubos, identificarlos y conservarlos en hielo si se van a usar inmediatamente, o a < -15 °C.		

¹En caso de un nuevo análisis, cada solución individual obtenida puede almacenarse a temperatura ambiente o a +2/8 °C durante 24 horas, tras lo cual se debe almacenar a < -15 °C.

²Se pueden hacer grupos de hasta 25 mezclando, por ejemplo, 50 µl de cada solución obtenida individualmente. Homogeneizar.

VI. Amplificación

a- Determinar el número de muestras a analizar, incluyendo los controles utilizados (por ejemplo, controles de extracción positivos y negativos, control de amplificación positivo ("CTL+") y reactivo control de amplificación (NTC)).

b- Descongelar el reactivo "A5" a temperatura ambiente. Homogeneizar bien. Dispensar 20 µl en cada uno de los tubos de PCR o pocillos de la placa de PCR con una pipeta provista de puntas sin nucleasas.

c- **Devolver inmediatamente el tubo "A5" a < -15 °C y dejar en un lugar oscuro.**

d- Para cada muestra, el control negativo de extracción (obligatorio) y el control positivo de extracción (recomendado), añadir 5 µl de extracto purificado a los 20 µl de reactivo "A5".

Para CTL+, añadir 5 µl de la solución (§ III.3.) a los 20 µl de reactivo "A5".

Para el reactivo control de amplificación (NTC), no añadir nada al reactivo "A5".

Devolver inmediatamente los extractos de ARN purificados a +2/8 °C o < -15 °C Eliminar las burbujas que puedan quedar en el fondo de los pocillos.

e- Mantener la placa o los tubos dentro de hielo en proceso de fusión o a +2/8 °C, hasta que se programe el reciclador. Iniciar el análisis rápidamente después de colocar la placa o los tubos en el reciclador.

La diana del virus de la DVB se lee en FAM. El control interno se lee en VIC o HEX. El Quencher no es fluorescente. La mezcla contiene una referencia pasiva ROX para los dispositivos ABI. La lectura de fluorescencia se realiza durante la etapa de elongación (a 60 °C).

Los programas siguientes han sido desarrollados para los dispositivos ABI Prism (tipo 7500, Step-one...) de **Applied Biosystems** (marcar la opción "emulación 9600" cuando exista), para los **MX300AP**, **AriaMx** de Agilent, los **LightCycleur** de **Roche Diagnostics**, el **CFX96** de **Biorad**.

Programa estándar		Programa FAST	
10 min. 45 °C		10 min. 45 °C	
10 min. 95 °C		10 min. 95 °C	
15 seg. 95 °C	45 ciclos	5 seg. 95 °C	45 ciclos
1 min. 60 °C		30 seg. 60 °C	

* Dejar 32 segundos para el 7500 Thermofisher

** Dejar 30 segundos para el MX3005P

Póngase en contacto con nosotros si desea utilizar otros dispositivos.

VII. Interpretación de los resultados

1. Definiciones

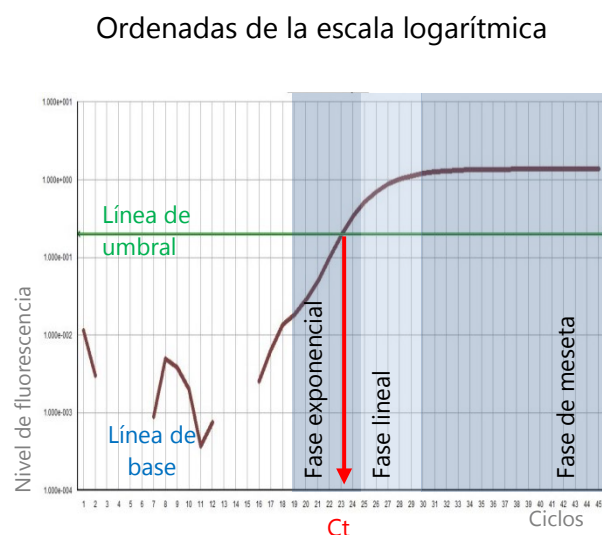
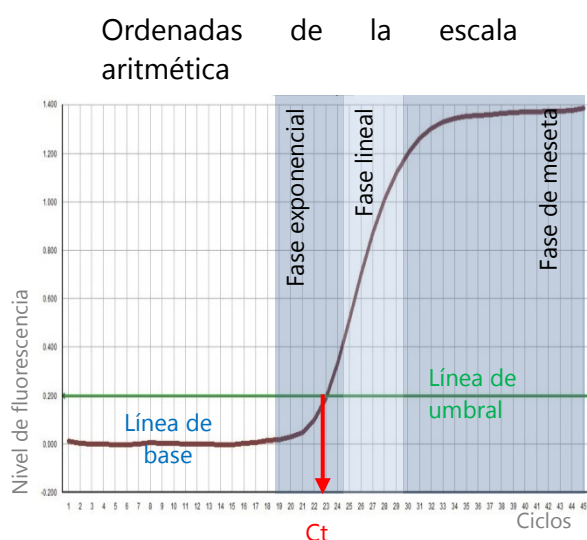
El término "**línea de base**" se refiere a la fluorescencia de fondo observada durante los primeros ciclos de amplificación antes de que la fluorescencia aumente significativamente.

El término "**curva de amplificación característica**" describe una curva de fluorescencia con una fase exponencial, una fase lineal y una fase de meseta.

La "**línea de umbral**" debe situarse por encima de la línea de base en la fase exponencial de una curva de amplificación característica o de un conjunto de curvas de amplificación características.

El "**ciclo umbral**" (**Ct**) de un pocillo es la abscisa del punto de intersección entre la línea umbral y la curva de amplificación para cada fluoróforo detectado. El valor Ct expresado por el instrumento para cada pocillo depende, pues, de la posición de la línea de umbral y de la carga inicial de analito en el tubo de PCR.

Ejemplo de curva característica de amplificación:



2. Validación e interpretación de los resultados

Visualizar todas las curvas de la placa en FAM y posicione la línea de umbral como se ha descrito anteriormente. Proceder de la misma manera para las curvas VIC o HEX.

A. Validación del ensayo

La amplificación se considera válida si se obtienen los siguientes resultados en los controles:

Controles	Reactivo control (NTC)	BVDV CTL+	Control de extracción negativo	Control positivo de extracción *
Amplificación FAM	No	Sí	No	Sí
Amplificación VIC/HEX	No	No/Sí	No	No/Sí
Validación de	Ausencia de contaminación para la amplificación	Amplificación de la cepa diana	Ausencia de contaminación para la amplificación	Pasos de extracción y amplificación

*opcional

Los valores indicativos del Ct (Ciclo umbral) alcanzados en FAM y VIC/HEX para el control positivo ("BVDV CTL+") se indican en el certificado de análisis del kit.

B. Interpretación de los resultados

La extracción de ARN y la amplificación se consideran **válidos** para cada una de las muestras si se observa al menos una curva de amplificación característica en virus de la DVB (FAM) y/o en el control interno (VIC o HEX).

Ejemplo	A	B	C
Amplificación FAM	No	Sí	No
Amplificación VIC/HEX	Sí	No/ Sí	No
Resultado	No detectado	Detectado	No determinado A repetir

Ejemplo A: La muestra se considera **no detectada** si se observa una curva de amplificación característica en VIC o HEX sin una curva de amplificación característica en FAM.

Ejemplo B: La muestra se considera **detectada** si se observa una curva de amplificación característica en FAM. El control interno puede ser co-amplificado.

Ejemplo C: La ausencia total de una curva de amplificación característica para una muestra (ejemplo D) indica una deficiencia en la extracción del ARN (pérdida o destrucción del ARN) o una RT-PCR en tiempo real defectuosa (presencia de inhibidores en la muestra, error del programa o falta de muestra). En este caso, es aconsejable repetir la prueba utilizando el extracto de ARN puro diluido 1:10 en agua sin nucleasas. En un segundo paso, si la prueba aún no está validada, es conveniente realizar una nueva extracción de ARN total de la muestra.

Caso especial de crotales auriculares en lisis directa con el tampón ADIAPURE™ TLB:

Los crotales auriculares suelen analizarse en grupos.

Este grupo puede contener muestras que inhiben parcial o totalmente la reacción de PCR y enmascaran los positivos.

Así, para los análisis de **lisis directa con el tampón ADIAPURE™ TLB**, proponemos el siguiente esquema de interpretación y decisión.

Ejemplo	A	B	C	D
Amplificación FAM	No	Sí	No	No
Amplificación VIC/HEX	Ct < 27*	No/ Sí	No	Ct > 27*
Resultado	No detectado	Detectado	Inhibido	Potencialmente inhibido
Recomendaciones			Análisis de un grupo: Prueba de las muestras individualmente Análisis individual: Probar la muestra pura y diluida a 1:10	Análisis de un grupo: Prueba de las muestras individualmente Análisis individual: Prueba de la muestra diluida a 1:10

* El umbral Ct del control interno indicado es un valor indicativo. Se determinó en un estudio de más de 10 000 análisis con el protocolo CLASSIC Lysis. Este valor puede variar en función de las condiciones de funcionamiento, por lo que debe definirse para cada laboratorio.

Ejemplo A: La muestra se considera **no detectada** si se observa una curva de amplificación característica **con un Ct inferior al Ct umbral** en VIC o HEX sin una curva de amplificación característica en FAM.

Ejemplo B: La muestra se considera **detectada** si se observa una curva de amplificación característica en FAM. El control interno puede ser co-amplificado.

Ejemplo C: La ausencia total de una curva de amplificación característica para una muestra (ejemplo D) indica una deficiencia en la extracción del ARN (pérdida o destrucción del ARN) o una RT-PCR en tiempo real defectuosa (presencia de inhibidores en la muestra, error del programa o falta de muestra).

Ejemplo D: Las muestras con un Ct de control positivo interno (CPI) por encima del Ct umbral son parcialmente inhibidas o pobres en células huésped.

VIII. Índice de símbolos

Símbolo	Significado
	Referencia del catálogo
	Fabricante
	Límite superior de temperatura
	Utilizar hasta
	Código del lote
	Consultar las instrucciones de uso
	Contenido suficiente para «n» tests
	Conservar protegido de la luz
	Para uso veterinario <i>in vitro</i> únicamente – Para uso animal únicamente

Bio-X Diagnostics, los logos, ADIAGENE, ADIAPURE™ y ADIAVET™ son marcas utilizadas, patentadas o registradas que pertenecen a ADIAGENE y/o Bio-X Diagnostics, alguna de sus filiales o alguna de sus sociedades. Las demás marcas y nombres de productos mencionados pertenecen a sus respectivos propietarios.



**S.A.S. ADIAGENE**
9, rue Gabriel Calloët-Kerbrat
22440 Ploufragan - Francia

RCS 417 876 299
Tel. +33 (0)2 96 68 40 20
www.biox.com