

ADIAVET™ AIV REAL TIME

PRUEBA PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR Tipo A MEDIANTE AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA EN TIEMPO REAL (PRUEBA RT-PCR Tiempo real)

Referencias:

ADI283-100 (100 reacciones)
ADI283-500 (500 reacciones)



NOTA

Los fluorocromos presentes en este producto se venden bajo licencia de Biosearch Technologies, Inc., y están protegidos por patente emitidas o pendientes en los Estados Unidos y en todo el mundo. La licencia cubre el Diagnóstico Molecular Veterinario.

ADIAVET™ AIV REAL TIME

I.	HISTORIAL DE REVISIONES	3
II.	INFORMACIÓN GENERAL	4
1.	Agente patógeno.....	4
2.	Descripción y principio de la prueba	4
III.	MATERIAL Y REACTIVOS.....	5
1.	Reactivos suministrados en el kit.....	5
2.	Validez y conservación	5
3.	Utilización de los controles.....	5
A.	Utilización del control positivo	5
B.	Utilización del control negativo	5
4.	Material necesario, pero no suministrado en el kit.....	5
IV.	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y LOS CONTROLES	7
1.	Precauciones.....	7
2.	Almacenamiento de muestras y extractos de ARN	7
3.	Preparación de las otras muestras para los otros campos de aplicación.....	8
A.	Hisopos	8
B.	Tejidos	8
C.	Excremento.....	8
D.	Plumas inmaduras.....	8
E.	Tarjetas FTA.....	8
4.	Controles a incluir	9
V.	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	10
1.	Con el kit RNeasy®	10
2.	Con el kit NucleoSpin® RNA.....	11
3.	Con el kit QIAamp® Viral RNA.....	12
4.	Con el kit ADIAMAG	12
VI.	AMPLIFICACIÓN	13
VII.	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	14
1.	Definiciones.....	14
2.	Validación e interpretación de los resultados.....	14
A.	Validación del ensayo	14
B.	Interpretación de los resultados	15
VIII.	ÍNDICE DE SÍMBOLOS	16

I. Historial de revisiones

N/A	No aplica (primera publicación)
Corrección	Corrección de errores en la documentación
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 revisión	Referencia	Tipo de revisión	Revisión realizada
2022/09	NS283-01	N/A	No aplica (primera publicación)

II. Información general

1. Agente patógeno

Los virus de la influenza pertenecen al género Influenzavirus de la familia de los *Orthomyxoviridae* que incluyen 5 géneros: Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogotovirus e Isavirus. Se trata de ARN de cadena simple de sentido negativo, divididos en dos subtipos basados en dos glucoproteínas de superficie: la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N). Actualmente, se han descrito 16 subtipos de hemaglutininas (H1-H16) y 9 subtipos de neuraminidasas (N1-N9).

Solo los Influenzavirus de tipo A (IA) infectan a los pájaros de cría (pollos, pavos, codornices, pintadas, etc.), así como a los pájaros ornamentales y salvajes. Ocasionalmente, los mamíferos, incluidos los seres humanos, pueden contraer la influenza aviar.

Existen numerosas cepas del virus de la influenza aviar, que se clasifican en dos categorías, débilmente patógenas o altamente patógenas. Un virus IA se clasifica como altamente patógeno si se cumplen uno de los dos criterios siguientes:

- determinación de un índice de patogenicidad por vía intravenosa (IPIV) superior a 1,2
- presencia de una secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de la hemaglutinina similar a una secuencia ya observada en las muestras de IA altamente patógenas (presencia de varios aminoácidos básicos)

Todos los H5/H7 (IAAP o IADP) son de declaración obligatoria a la OIE. Todos los otros virus influenza no son de declaración obligatoria.

El virus de la influenza se contagia por contacto directo (pájaro a pájaro) pero también por contacto indirecto con el material o los equipos contaminados. El virus se excreta en las heces de los pájaros infectados y en las secreciones del tracto respiratorio.

2. Descripción y principio de la prueba

Esta prueba está basada 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™ AIV REAL TIME puede detectar de forma simultánea

- virus Influenza (sonda marcada con FAM)
- GAPDH como control interno de extracción y de amplificación específica de ADN 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, Macherey-Nagel). Se pueden utilizar otros kits de purificación si han sido validados por el usuario.

Esta prueba se puede utilizar para la detección del Influenzavirus procedente de aves de corral a partir de:

Muestra	Análisis individual	Análisis en mezcla*, posible hasta
Hisopo (traqueal, orofaríngeo, cloacal...)	✓	5
Tejido (hígado-bazo-riñón-páncreas-corazón, intestino, pulmón-tráquea, encéfalo)	✓	5
Pluma	✓	5
Tarjeta FTA	✓	☒
Excremento	✓	☒

* mezcla de 1 a 5 muestras sin tratamiento individual

III. Material y reactivos

1. Reactivos suministrados en el kit

REF ADI283-100

A5 solución de amplificación
AIV CTL+ control positivo AIV
AIV CTL- control negativo AIV
NF-Water Agua sin nucleasas

2 tubos con tapón verde de 1000 µL (reactivo listo para usar)
1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
1 tubo con tapón blanco de 1000 µL (reactivo listo para usar)

Instrucciones descargables en www.biox.com

REF ADI283-500

A5 solución de amplificación
AIV CTL+ control positivo AIV
AIV CTL- control negativo AIV
NF-Water Agua sin nucleasas

10 tubos con tapón verde de 1000 µL (reactivo listo para usar)
1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
1 tubo con tapón blanco de 1000 µL (reactivo listo para usar)

Instrucciones descargables en www.biox.com

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 RT-PCR.

No mezclar reactivos de diferentes lotes.

3. Utilización de los controles

Estos controles se pueden sustituir por un control positivo apropiado y calibrado que permita la validación del conjunto del proceso analítico (extracción y RT-PCR) en cada ensayo.

A. Utilización del control positivo

Añadir **200 µL** de "NF-Water" al «AIV CTL+» suministrado en el kit (**recomendado**). Homogeneizar el tubo mediante un agitador de tipo vórtex, al menos 20 segundos. Alicuotar esta solución en 6 o 12 µL y almacenar a <-15 °C.

Para cada prueba, recomendamos utilizar 5 µL de "AIV CTL+" en uno de los pocillos.

B. Utilización del control negativo

Añadir **200 µL** de "NF-Water" al «AIV CTL-» suministrado en el kit. Homogeneizar el tubo mediante un agitador de tipo vórtex, al menos 20 segundos. Alicuotar esta solución en 6 o 12 µL y almacenar a <-15 °C.

Para cada prueba, recomendamos utilizar 5 µL de "AIV 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
- Molino mezclador (Mixer Mil o Fast Prep)
- Centrifugadora para microtubos
- 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
- Guantes de látex sin polvo
- Cuchillas de escarpelo
- Molino mezclador (tipo Mixer Mill)
- Esferas de acero inoxidable (3 mm)

- Etanol 96 - 100 %
- Agua sin nucleasas
- Suero fisiológico estéril (NaCl 8,5 g/l)
- Solución tamponada con fosfato STP o similar (composición según NF U47-210)
- Medio MEM + antibióticos (por ejemplo 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) (con miras a un posible aislamiento viral posterior)
- β-mercaptoetanol 14,5 M

Kits de extracción de ARN:

- Kit de extracción de ARN sobre columna de silicio:
 - RNeasy® Mini Kit (Qiagen, 50 extracciones: ref. 74104 o 250 extracciones: ref. 74106)
 - QIAamp® Viral RNA (Qiagen, 50 extracciones: ref. 52904 o 250 extracciones: ref. 52906)
 - NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, 50 extracciones: ref. 740955.50 o 250 extracciones: ref. 740955.250)
- Kit de extracción de ARN/ADN con esferas magnéticas en modo automatizado:
 - ADIAMAG (Bio-X Diagnostics; 200 extracciones: ref. NADI003; 800 extracciones: ref. NADI003-XL).

Kits complementarios disponibles para la adopción del método y la PCR (AFNOR NF U47-600):

- ADIAVET™ AIV & H5-H7 Extraction Positive Control (ref.: ADI283-531-8). (Material de referencia proveedor para adopción de método que también puede ser utilizado como centinela).
- ADIAVET™ LD_{PCR} Positive Control - AIV (ref. ADI283-LD) Confirmación del rendimiento - LD_{PCR} del kit ADIAVET™ AIV REAL TIME).

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, Bio-X Diagnostics y Macherey-Nagel. 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 y asegurar el seguimiento de las versiones de las instrucciones.

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 en tiempo real 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 alícuotas 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

Se recomienda la conservación de las muestras en frío. Si las muestras no se pueden procesar en menos de 24 horas, se recomienda conservarlas a <-15 °C, o a <-65 °C en caso de análisis oficiales o de autocontrol.

Los ARN extraídos son moléculas sensibles. La extracción se realiza a temperatura ambiente (18 - 25 °C) y por lo tanto, se debe llevar a cabo lo más rápido posible para evitar las degradaciones. Se aconseja leer la totalidad del protocolo y preparar bien cada manipulación antes de iniciar la extracción de ARN. Los lisados se pueden almacenar inmediatamente después de la extracción en hielo o a +2/8 °C durante unas horas, y después deben conservarse a <-15 °C, o a <-65 °C en el caso de análisis oficiales o de autocontrol.

3. Preparación de las otras muestras para los otros campos de aplicación

En particular, para el estudio, para la investigación y para el estudio epidemiológico. Estos protocolos no han sido validados por el LNR:

A. Hisopos

Introducir 1 hisopo en **1 ml** de medio MEM (+/-antibióticos) o de solución tamponada con fosfato (STP) (o similar).

Agitar con vórtex.

Para las mezclas de 5 hisopos (según el tipo de muestra, y salvo indicación diferente según la especie de pájaro, el lugar geográfico, la fecha de muestreo), mezclar volumen a volumen cada sobrenadante.

Extraer **200 µL de muestra o de mezcla.**

o

Introducir de 1 a 5 hisopos en **2 ml** de suero fisiológico.

Agitar con vórtex y extraer **200 µL** de la solución obtenida.

Nota: Conservar el resto a <-15 °C con miras a un nuevo análisis.

Ver § V para la extracción y purificación del ARN.

B. Tejidos

Introducir de **0,1 a 0,2 g** de órgano en un tubo de 2 ml que contenga 1 ml de suero fisiológico.

Añadir una esfera de acero inoxidable.

Triturar 2 minutos a 30 Hz (Mixer Mill).

Centrifugar 2 minutos a 6000 g.

Para las mezclas 5 órganos, mezclar volumen a volumen cada sobrenadante.

Extraer **200 µL** de la solución obtenida o de la mezcla.

Nota: Conservar el resto a <-15 °C con miras a un nuevo análisis.

Véase § V para la extracción y la purificación de los ARN siguiendo el protocolo de extracción específico de las muestras biológicas líquidas.

C. Excremento

Introducir **1 g** de heces o de mezcla de heces en un tubo.

Añadir **5 ml** de suero fisiológico.

Agitar con vórtex.

Dejar sedimentar 5 minutos

Extraer **200 µL** de la solución obtenida.

Nota: Conservar el resto a <-15 °C con miras a un nuevo análisis.

Véase § V para la extracción y la purificación de los ARN siguiendo el protocolo de extracción específico de las muestras biológicas líquidas.

D. Plumas inmaduras

Cortar el extremo del cálamo de 1 a 5 plumas, hacerlo con mucho cuidado para evitar salpicaduras, e introducir en **2 ml** de suero fisiológico.

Agitar con vórtex y extraer **200 µL** de la solución obtenida.

Nota: Conservar el resto a <-15 °C con miras a un nuevo análisis.

Véase § V para la extracción y la purificación de los ARN siguiendo el protocolo de extracción específico de las muestras biológicas líquidas.

E. Tarjetas FTA

Cortar la tarjeta FTA y transferir los trozos en un tubo de 2 ml

Añadir **1 ml** de suero fisiológico.

Agitar con vórtex y extraer **200 µL** de la solución obtenida.

Nota: Conservar el resto a <-15 °C con miras a un nuevo análisis.

Véase § V para la extracción y la purificación de los ARN siguiendo el protocolo de extracción específico de las muestras biológicas líquidas.

4. Controles a incluir

Se deben incluir varios controles en cada serie de extracción.

El control interno endógeno (GAPDH), presente de forma natural en las células del animal, se utiliza para verificar la extracción y amplificación de cada muestra. El control "AIV CTL+" valida la amplificación de la cepa diana. El control «AIV CTL-» permite validar la amplificación del IPC.

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 NF 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 de la influenza aviar. 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 influenza aviar. 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.

V. Extracción y purificación

Todas las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente (18 - 25 °C).

1. Con el kit RNeasy®

	Líquidos biológicos obtenidos en la fase IV
Lisis	Añadir 350 µL de tampón RLT+ β-Mercaptoetanol (10 µL/ml) a los 200 µL de muestra preparada según lo descrito anteriormente. Homogeneizar.
Preparación de la fijación	Añadir 350 µL de etanol al 70 % . Homogeneizar.
Transferencia a las columnas y fijación a la membrana	Identificar las columnas, verter 700 µL de la mezcla en la columna correspondiente. Centrifugar 1 minuto a 8000 g.
1.º lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 700 µL de tampón RW1 a la columna. Centrifugar 1 minuto a 8000 g.
2.º lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 500 µL de tampón RPE . Centrifugar 1 minuto a 8000 g.
3.º lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 500 µL de tampón RPE . <i>Opcional: centrifugar 1 minuto a 8000 g, cambiar el tubo colector.</i> Centrifugar 3 minutos a 10 000 g.
Secado de la columna	Cambiar el tubo colector. Centrifugar 1 minuto a 10000 g.
Elución	Transferir la columna a un microtubo. Depositar 50 µL de agua sin nucleasas (NF-Water) . Incubar ~2 minutos a temperatura ambiente (18 - 25 °C) y centrifugar 1 minuto a 10 000 g.
Conservación	Cerrar los tubos, identificarlos y conservarlos en hielo si se van a usar inmediatamente, a <-15 ° o a < -65 °C.

2. Con el kit NucleoSpin® RNA

	Líquidos biológicos obtenidos en la fase IV
Lisis	Añadir 350 µL de tampón RA1+ β-Mercaptoetanol (10 µL/ml) a los 200 µL de muestra preparada según lo descrito anteriormente. Homogeneizar.
Preparación de la fijación	Añadir 350 µL de etanol al 70 % . Homogeneizar.
Transferencia a las columnas y fijación a la membrana	Identificar las columnas, verter 700 µL de la mezcla en la columna correspondiente. Centrifugar 30 segundos a 11 000 g.
1.º lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 350 µL de tampón MDB . Centrifugar 1 minuto a 11 000 g.
2.º lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 200 µL de tampón RAW2 a la columna. Centrifugar 30 segundos a 11 000 g.
3.º lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 600 µL de tampón RA3 a la columna. Centrifugar 30 segundos a 11 000 g.
4.º lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 250 µL de tampón RA3 a la columna. <i>Opcional: centrifugar 30 segundos a 11 000 g, cambiar el tubo colector.</i> Centrifugar 2 minutos a 11000 g.
Elución	Transferir la columna a un microtubo. Depositar 60 µL de agua sin nucleasas (NF-Water) . Incubar ~2 minutos a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C) y centrifugar 1 minuto a 11 000 g.
Conservación	Cerrar los tubos, identificarlos y conservarlos en hielo si se van a usar inmediatamente, a <-15 ° o a < -65 °C.

3. Con el kit QIAamp® Viral RNA

	Líquidos biológicos obtenidos en la fase IV
Lisis	Añadir 560 µL de tampón AVL + Carrier RNA a los 200 µL de muestra preparada como se ha descrito anteriormente. Homogeneizar.
	Incubar 10 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C). Centrifugar brevemente.
Preparación de la fijación	Añadir 560 µL de etanol al 100 % . Homogeneizar.
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 10000 g. Cambiar el tubo colector, depositar el resto de la mezcla y centrifugar 1 minutos a 10 000 g.
1 ^{er} lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 500 µL de tampón AW1 a la columna. Centrifugar 1 minuto a 10000 g.
2º lavado	Cambiar el tubo colector y añadir 500 µL de tampón AW2 . Centrifugar 1 minuto a 10000 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 tampón AVE . Incubar ~1 minuto a temperatura ambiente (18 - 25 °C) y centrifugar 1 minuto a 10 000 g.
Conservación	Cerrar los tubos, identificarlos y conservarlos en hielo si se van a usar inmediatamente, a <-15 ° o a < -65 °C.

4. Con el kit ADIAMAG

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

VI. Amplificación

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

b- Descongelar el reactivo "A5" a temperatura ambiente (18 - 25 °C). 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 los controles de amplificación, añadir **5 µL** por pocillo 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".

Guardar inmediatamente los extractos de ARN purificados a +2/8 °C o a <-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 influenza 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 (1 minuto a 60 °C).

El programa siguiente ha sido desarrollado para los aparatos **ABI Prism** (type 7500, Step-one...) de **Applied Biosystems** (marcar la opción «emulation 9600» si existe), para el **Rotorgene** de **Qiagen**, para los **Chromo 4** et **CFX96 Touch™** de **Biorad** y para el **AriaMx** de **Agilent**:

10 minutos a 45 °C

10 minutos a 95 °C

15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C durante 40 ciclos

El siguiente programa hace referencia a los **MX3000P** y **MX3005P** de **Agilent**:

10 minutos a 45 °C

10 minutos a 95 °C

30 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C durante 40 ciclos

También se puede utilizar el programa estándar ARN utilizado con los otros kits RT-PCR de la gama ADIAVET™ con 45 ciclos.

Roche diagnostic: LightCycler 2*, LightCycler 480*

***NOTA:** La utilización de recicladores térmicos *LightCycler* necesita una calibración previa. Suministramos el procedimiento y los reactivos necesarios para esta calibración.

Póngase en contacto con nosotros si desea utilizar otros dispositivos.

VII. Interpretación de los resultados

1. Definiciones

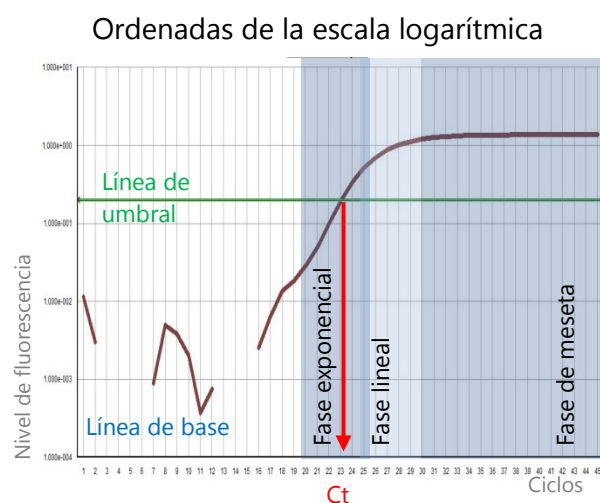
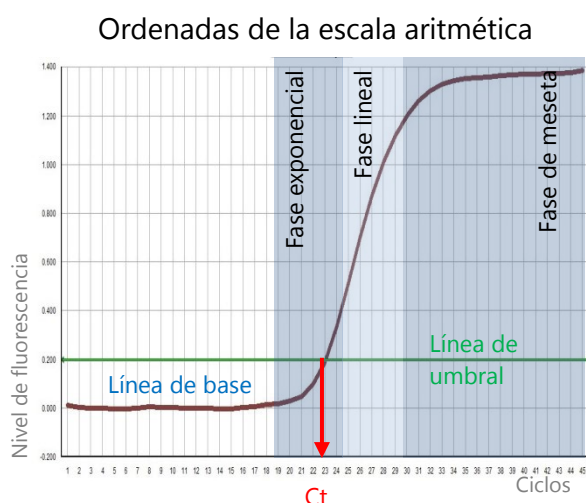
El término "**línea de base**" se refiere a la fluorescencia de fondo observada durante los primeros ciclos de amplificación antes de que la fluorescencia aumente significativamente.

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)	AIV CTL+	AIV CTL ^{-a}	Control de extracción negativo	Control de extracción positivo ^a
Amplificación FAM	no	sí	no	no	sí
Amplificación VIC/HEX	no	no/sí ^b	sí	no/sí ^c	no/sí ^c
Validación de	Ausencia de contaminación para la amplificación	Amplificación de la cepa diana	Amplificación del IPC	Ausencia de contaminación para la amplificación	Pasos de extracción y amplificación

^a opcional

^b según las características del lote del CTL+ del kit (presencia o no del gen endógeno)

^c según el tipo de control

Los valores indicativos del Ct alcanzados en FAM y VIC/HEX para los controles de amplificación («AIV CTL+» y «AIV CTL-») se especifican 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 influenza aviar (FAM) y/o en el control interno (VIC o HEX).

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

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 A).

La muestra se considera **detectada** si se observa una curva de amplificación característica en FAM (ejemplo B). 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.

La presencia de los subtipos H5 y/o H7 se puede determinar, a partir del mismo extracto, utilizando una prueba específica ADIAVET™ AIV H5-H7 REAL TIME (ref. ADI531).

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, ADIALYO, ADIAGENE 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 en este documento 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