



# Adia<sup>X</sup> Lyo

Instrucciones de uso  
ADL67Y1-PCV2\_NO\_(ES)\_V03  
06/2024

## PCV2

Referencia: ADL67Y1-100

Test para la detección del circovirus porcino de tipo 2 (Porcine CircoVirus 2) mediante amplificación enzimática en tiempo real

Test PCR – 100 reacciones

Para uso veterinario *in vitro* únicamente



Muestra	Análisis individual	Análisis en mezcla *, posible hasta
Suero	✓	5
Sangre	✓	5
Órganos (pulmón, corazón, abortón)	✓	5

\*depende de la calidad de la muestra y de la situación epidemiológica

## Composición del test

Material suministrado		Kit
		100 reacciones
A6	Solución de amplificación	1 frasco liofilizado (para reconstituir)
Tampón de rehidratación	Solución de rehidratación	1 frasco de 6 mL (reactivo listo para usar)
PCV2 CTL+	Control positivo circovirus porcino tipo 2	1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
Agua NF	Agua sin nucleasas	2 tubos con tapón blanco de 1000 µL (reactivo listo para usar)

## Historial de revisiones

Fecha	Versión	Modificaciones
04/2022	V01	Cambiar al formato simplificado (primera versión)
11/2022	V02	Adaptación del envase a 100 reacciones
06/2024	V03	Error en el título del control interno de la prueba en "\$B Objetivo del test".

Nota: los cambios menores de tipografía, gramática y formato no se incluyen en el historial de revisiones.

## A. Introducción

Los agentes involucrados en la enfermedad del desmedro del lechón y en el síndrome Dematitis y Nefropatía Porcina son virus ADN de la familia circoviridae. Son los responsables de una de las principales enfermedades que afectan la producción porcina con un importante impacto económico a nivel mundial.

## B. Objetivo del test

El test ADIALYO™ PCV2 se basa en la amplificación génica de fragmentos de ADN específicos del PCV2. Detecta simultáneamente en monocúpula:

- el circovirus porcino de tipo 2 (sonda marcada con FAM)
- RNase P: Control interno de extracción y amplificación específico de un ácido nucleico endógeno (sonda etiquetada HEX o su equivalente).

El control positivo PCV2 CTL+ suministrado en el kit permite cuantificar el circovirus porcino de tipo 2.

## C. Condiciones de conservación

- Tras su recepción, conservar el kit a +4/8 °C en un lugar seco.
- Los reactivos reconstituídos se deben dividir en alícuotas y conservar a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit.
- Conservar protegido de la luz.
- No descongelar más de 3 veces.

## D. Material y reactivo necesarios, pero no suministrados

- Reciclador térmico con su consumible para PCR en tiempo real.
- 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 o nitrilo sin polvo.
- Agua sin nucleasas.
- Kit de extracción de ácidos nucleicos.

## E. Precauciones de uso y seguridad

- Para uso veterinario *in vitro* únicamente.
- Para uso animal únicamente.
- Para uso profesional únicamente.
- Leer el protocolo en su totalidad antes de empezar y seguirlo escrupulosamente.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad del kit.
- No utilizar los reactivos si el embalaje está deteriorado.
- No mezclar reactivos de diferentes lotes.
- No abrir los tubos PCR tras la amplificación.
- Elimine el material usado de acuerdo con la legislación vigente sobre protección del medio ambiente y gestión de residuos biológicos.
- Esta caja contiene componentes de origen animal. Conocer el origen o el estado sanitario de los animales no puede garantizar de forma absoluta que estos productos no contengan ningún agente patógeno transmisible, por lo que se recomienda manipularlos con las precauciones de uso relativas a los productos potencialmente infecciosos (no ingerir; no inhalar).

## F. Extracción de ácidos nucleicos

### 1. Kits de extracción

Los ADN se deben extraer de las muestras antes de utilizar el kit. Bio-X Diagnostics recomienda los kits de extracción de ADN/ARN que se detallan a continuación:

Nombre del producto	Tecnología de extracción	Número de tests y referencia
ADIAMAG	Esferas magnéticas	200 tests : ref. NADI003 800 tests : ref. NADI003-XL
QIAamp® DNA Mini Kit	Columna de silicio	50 tests: ref. 51304 250 tests: ref. 51306
NucleoSpin® Tissue	Columna de silicio	50 tests: ref. 740952.50 250 tests: ref. 740952.250

Para la extracción, consulte la versión de las instrucciones disponibles en el sitio web, indicada en el certificado de análisis incluido en el kit de PCR utilizado.

Se pueden utilizar otros kits de extracción una vez que hayan sido validados por el usuario.

Tras la extracción, los ácidos nucleicos extraídos se pueden conservar en hielo o a +2/8 °C durante 24 horas o hasta su utilización. Para prolongar la conservación, se deberán conservar a una temperatura inferior a -15 °C o -65 °C.

### 2. Testigos para incluir

El uso de controles permite comprobar la fiabilidad de los resultados. Los controles se incluyen por serie de análisis según las recomendaciones definidas por las normas vigentes (Cf. AFNOR U47-600...).

Control	Validación de	Procedimiento
Control reactivo (NTC)	ausencia de contaminación para la amplificación	5 µL Agua NF en un pozo por ejecución de PCR
PCV2 CTL+ (Dilución puro a 1/10 000)	amplificación de la cepa diana de PCV2 y rango de referencia	5 µL CTL+ para cada punto de rango en un pozo por ejecución de PCR
Control negativo de extracción	Ausencia de contaminación para la extracción y la amplificación	1 extracción (agua o tampón de lisis) por serie de extracción
Control positivo de extracción	Fases de extracción y de amplificación	1 extracción (Muestra positiva entre 1 y 100x LD <sub>Método</sub> ) por serie de extracción

## G. Procedimiento

### 1. Preparación de la solución de amplificación A6

- Añadir **1000 µL** de «Solución de rehidratación» por tubo de A6.
- Homogeneizar el tubo mediante un agitador de tipo vórtex > 20 segundos.
- Tras la reconstitución, dividir en alícuotas y conservar la solución a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit. No descongelar más de 3 veces.
- Para información sobre la utilización, consultar el apartado «Amplificación», paso 1.

### 2. Preparación de los controles

- Añadir **200 µL** de «Agua NF» por tubo.
- Homogeneizar el tubo con un agitador tipo vórtex > 20 segundos, hasta la disolución completa del residuo azul.
- Tras la reconstitución, dividir en alícuotas la solución y conservarla a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit. No descongelar más de 3 veces.
- Para información sobre la utilización del PCV2 CTL+ :
  - consultar el apartado «Amplificación», paso 1.
  - Para el análisis PCR cuantitativo, preparar, antes de la utilización, un rango de referencia con agua sin nucleasas:

Dilución	Concentración (copias/PCR) del PCV2 CTL+
puro	5.10 <sup>5</sup>
1/10	5.10 <sup>4</sup>
1/100	5.10 <sup>3</sup>
1/1000	5.10 <sup>2</sup>
1/10000	5.10 <sup>1</sup>

- Se utilizarán **5 µL de cada dilución** «PCV2 CTL+» por ensayo (§ «Amplificación», paso 2).

### 3. Amplificación

#### Atención:

- Antes de empezar, descongelar los reactivos a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
- Homogeneizar todos los reactivos y las muestras antes de su utilización.
- Tras la distribución, volver a refrigerar los reactivos a una temperatura inferior a -15 °C.
- Los ácidos nucleicos extraídos se conservan a +2/8 °C durante 24 horas, y después, a una temperatura inferior a -15 °C.

**Paso 1 :** Reparto de **10 µL** de reactivos de amplificación A6.

**Paso 2 :** Reparto de **5 µL** de los ácidos nucleicos extraídos de las muestras y **5 µL** de los controles en cada pocillo asignado. Utilice 10 µL de Agua NF para el control reactivo.

**Paso 3 :** Cerrar los pocillos con un film o pinzas adaptadas.

**Paso 4 :** Iniciar el análisis PCR.

El programa siguiente ha sido desarrollado para los dispositivos ABI Prism (tipo 7500, QuantiStudio5, Step-one...) de Applied Biosystems, para los Mx3000 y Mx3005P, AriaMx de Agilent, los LightCycler de Roche Diagnostics, el CFX96 y Chromo 4 de Biorad, para el MIC de BioMolecular System y el Rotorgene de Qiagen.

Programa ARN/ADN	
10 min. 45 °C	
2 min. 95 °C	
5 seg. 95 °C	40 ciclos
30 seg. 60 °C*	

\*Lectura y parámetros para la adquisición de la fluorescencia:

Fluorocromo	Absorbancia (nm)	Emisión (nm)
FAM	494	520
HEX o equivalente	538	554
ROX	575	602

**Nota:** El Quencher no es fluorescente. La mezcla contiene una referencia pasiva ROX para los dispositivos ABI.

Póngase en contacto con su representante comercial o el servicio al cliente para otros modelos de reciclador térmico.

## H. Lectura e interpretación de los resultados

### 1. Validación e interpretación de los resultados cualitativos

Genere todas las curvas y sitúe la línea de umbral para cada fluorocromo.

#### a. Validación del ensayo

La amplificación es válida si se obtienen los siguientes resultados. Los valores indicativos del Ct (ciclo umbral) alcanzados por el CTL+ se indican en el certificado de análisis del kit.

Control	Amplificación		Validación de
	FAM	HEX o equivalente	
Control reactivo (NTC)	No	No	Ausencia de contaminación para la amplificación
PCV2 CTL+	Sí	No	Amplificación de la cepa diana de PCV2
Control negativo de extracción	No	No	Ausencia de contaminación para la extracción
Control positivo de extracción	Sí	Sí/No	Fases de extracción y de amplificación

#### b. Interpretación de los resultados

La extracción de los ácidos nucleicos y la amplificación son válidos para cada una de las muestras si se observa al menos una curva de amplificación característica en FAM o HEX o equivalente.

Amplificación		Interpretación
FAM	HEX o equivalente	
No	No	No detectado
Sí	Sí / No	Detectado
No	No	No detectado

«**No determinado**»: ausencia de curva de amplificación característica. **Causas posibles:**

- PCR defectuosa (presencia de inhibidores, error de programa, ausencia de muestra o muestra demasiado degradada) y/o
- Deficiencia en la extracción de los ácidos nucleicos (pérdida o destrucción de los ácidos nucleicos).

**Acciones recomendadas:**

- Volver a hacer la PCR con el extracto de los ácidos nucleicos puro y diluido al 1/10 en agua sin nucleasas.
- Volver a hacer la extracción de los ácidos nucleicos si el test continúa sin ser válido o solicitar otra muestra.

### 2. Validación e interpretación de los resultados cuantitativos

#### a. Rango de referencia

Dilución PCV2 CTL+	Concentración (copias/PCR)	Amplificación		Validación de
		FAM	HEX o equivalente	
Puro	5.10 <sup>5</sup>	Sí	No	amplificación de la cepa diana de PCV2 y de la recta de calibración
1/10	5.10 <sup>4</sup>	Sí	No	
1/100	5.10 <sup>3</sup>	Sí	No	
1/1000	5.10 <sup>2</sup>	Sí	No	
1/10000	5.10 <sup>1</sup>	Sí	No	

Para la interpretación cuantitativa de los resultados, establecer una recta de calibración (número de ciclos = f (concentración logarítmica), calcular la ecuación de la recta ( $y = ax + b$ ) y comprobar la eficacia de la PCR ( $Eff\% = \left(10^{\frac{(-1)}{a}} - 1\right) \times 100$ ).

La recta de calibración es válida si:

- Los 5 puntos del rango están amplificados. No obstante, se podrá eliminar un punto del rango si dicho punto no es uno de los 2 extremos.
- El coeficiente de correlación R<sup>2</sup> es mayor que 0,9.
- La eficacia se encuentra entre el 75 % y el 125 %.
- El reparto de los puntos es homogéneo.

b. Interpretación de la cuantificación

La cuantificación de una muestra positiva solo es posible en el ámbito de la cuantificación del método utilizado (véase dossier de validación).

Amplificación	Estado de la muestra para PCV2
Ninguna señal	Negativo Ácido nucleico no detectado
Señal < LC <sub>MÉTODO</sub>	Positivo Ácido nucleico detectado en cantidad inferior a LC <sub>MÉTODO</sub>
LC <sub>MÉTODO</sub> < señal < LC <sub>máx.</sub>	Positivo Ácido nucleico cuantificable
Señal > LC <sub>máx.</sub>	Positivo Ácido nucleico detectado en cantidad superior a LC <sub>máx.</sub>

Si la muestra es «cuantificable», la concentración de PCV2 se determina mediante la ecuación del rango de referencia:

$$x = 10^{\left(\frac{y-b}{a}\right)} \times F$$

Donde x: concentración en PCV2 (copias/PCR)  
 y: valor de Ct en FAM de la muestra positiva a cuantificar  
 b: ordenada de origen de la recta  
 a: pendiente de la recta  
 F: factor multiplicador

El factor multiplicador se determina según la matriz de la muestra y el método de extracción.

Ejemplo de factor multiplicador tras la utilización del kit de extracción ADIAMAG según las instrucciones NFKF:

Matriz	Factor multiplicador (F)	Unidad
Suero/Sangre	200	copias/mL
Tejido	10	copias/ mg

## Tabla 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
	Para uso veterinario <i>in vitro</i> únicamente – Para uso animal únicamente
	Conservar protegido de la luz
	Conservar en un lugar seco

1 | Extraer los ácidos nucleicos con

**Adia<sup>X</sup>  
Mag**



Escanearme para descubrir Adiamag™

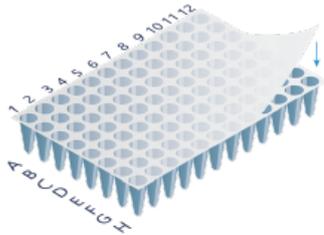
2 | Añadir **1000 µL** de Rehydration buffer al solución de amplificación **A6**



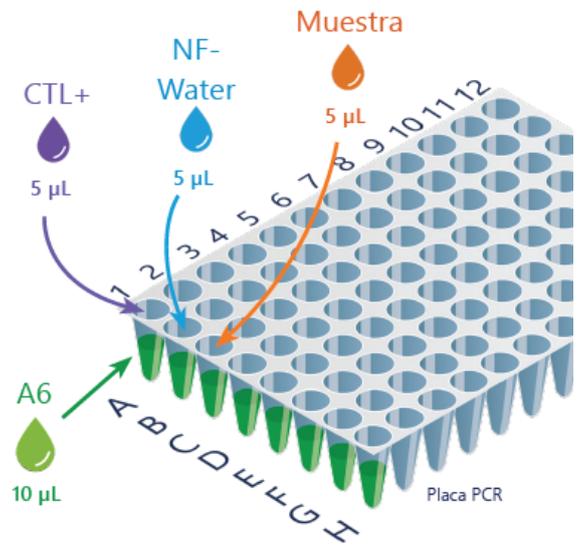
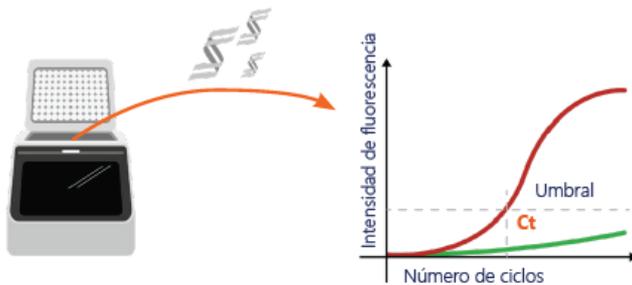
3 | Agregar **10 µL** de solución de amplificación **A6**

4 | Distribuir **5 µL** de ácidos nucleicos, CTL+ y NF-Water

5 | Sellar los pozos



6 | Iniciar el análisis PCR



\*Las notas no sustituyen a las instrucciones de uso de las que son una síntesis.