



Adia^X Lyo

Instrucciones de uso
ADL28Y1-FLUA_NO_(ES)_V02
04/2023

FLU A

Referencia: ADL28Y1-100

Test para la detección del virus Influenza A mediante amplificación enzimática del gen en tiempo real
Test PCR –100 reacciones

Uso *in vitro* y estrictamente veterinario



Especie	Muestra	Análisis individual	Análisis en mezcla*, posible hasta
	Hisopo (Cloacal, traqueal, orofaríngeo)	✓	10
	Tejido	✓	10
	Pluma	✓	
	Excrementos	✓	
	Muestra de medio ambiente	✓	
	Hisopo nasal	✓	5
	Tejido	✓	
	Lavado traqueo-bronquial	✓	
	Fluidos orales	✓	
	Muestra de medio ambiente	✓	
	Hisopo nasal	✓	
  	Tarjeta FTA	✓	
	Cultivo/líquido alantoideo	✓	

* Depende de la situación epidemiológica, de la calidad de la muestra y de las directivas específicas que existen en determinados países (consultar).

Composición del kit

Material suministrado		Kit ADL28Y1-100 100 reacciones
A6	Solución de amplificación	1 frasco liofilizado (para reconstituir)
Rehydration Buffer	Solución de rehidratación	1 frasco de 6 ml (reactivo listo para usar)
FLU A CTL+	Control positivo Influenza A	1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
EPC-Ext	Control de extracción o amplificación exógena	1 frasco liofilizado con tapón amarillo (para reconstituir)
NF Water	Agua sin nucleasas	2 tubos con tapón blanco de 1000 µL (reactivo listo para usar)

Historial de revisiones

Fecha	Versión	Modificaciones
06/2022	V01	Creación
08/2022	V01	Corrección de la tabla "Programa de ADN/ARN"
04/2023	V02	Adaptación del envase a 100 reacciones Adición de muestra medioambiental

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

Smart solutions for sharp decisions

A. Introducción

Los virus de la gripe pertenecen al género Influenzavirus de la familia de los *Orthomyxoviridae*. Existen en los animales, especialmente en las aves, los cerdos y los caballos. Pueden afectar a otras especies animales, sobre todo a mamíferos, aunque suelen ser asintomáticos. La gripe aviar está provocada por virus gripales del tipo A, concretamente los subtipos H5, H7 y H9. Estas cepas están clasificadas en dos categorías, débilmente patógenas o altamente patógenas. Todos los H5/H7 son de declaración obligatoria a la WOAH. En el cerdo, se pueden encontrar tres subtipos H1N1, H3N2 y H1N2. Son enzoóticos en Europa. En los caballos los subtipos que se encuentran son H3N8 y H7N7. El test ADIALYO™ FLU A amplifica una secuencia conservada del gen M específico de los Influenzavirus y de esta forma, detecta todos los subtipos encontrados en los animales.

B. Principio del test

El test ADIALYO™ FLU A está basado, primero, en la transcripción inversa (TI) del ARN del virus en ADN complementario. Esta reacción se continúa con la amplificación génica de fragmentos de ADN específicos del virus Influenza. Detecta simultáneamente en monocómpula:

- Virus Influenza A (sonda marcada con FAM)
- EPC-Ext: Control interno para la extracción y/o amplificación específica del ARN exógeno (sonda marcada con HEX o equivalente)

C. Condiciones de conservación

Tras su recepción, conservar el kit a +2/8 °C en un lugar seco. Los reactivos reconstituidos 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 reactivos necesarios, pero no suministrados en el kit

- 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

Kits complementarios para la adopción del método y PCR

- **Extraction Positive Control AIV (Ref.: ADC28EPC).** Material de referencia - proveedor para adopción del método que también puede ser utilizado como centinela (Calibrado entre 1 y 100xLD_{Método})
- **LDpcr Positive control FLU A (Ref.: ADC28YLD)** para Confirmación de resultados - LDpcr del kit.

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.
- Eliminar el material utilizado respetando la legislación en vigor en materia de protección del medio ambiente y de 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 ácidos nucleicos se deben extraer de las muestras antes de utilizar el kit. Bio-X Diagnostics recomienda y proporciona 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
ADIAPURE Lysis Flex	Lisis directa en hisopos aviares	500 mL: ref. ADPLF1-500

Para la extracción, consultar la versión de las instrucciones disponible en el sitio web, indicado en el certificado de análisis incluido en el kit 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 a +2/8 °C durante algunas horas antes de su utilización. Para prolongar la conservación, se deberán conservar a una temperatura inferior a -15 °C o -65 °C.

2. Controles

La utilización de controles permite controlar la fiabilidad de los resultados. Los controles se incluyen por serie de análisis.

Controles	Validación de	Procedimiento
Control reactivo (NTC)	Ausencia de contaminación para la amplificación	5 µL de agua NF en un pocillo por serie de PCR
FLU A CTL+	Amplificación de la diana Influenza	5 µL de solución FLU A CTL+ en un pocillo por serie 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 _{Método}) por serie de extracción

G. Procedimiento

1. Preparación de la solución de amplificación A6

- Añadir **1000 µL** de «Rehydration Buffer» 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», Fase 1.

2. Preparación de los controles

a. Utilización del EPC-Ext

Se debe añadir el EPC-Ext a cada de las muestras y a los controles.

- Añadir **1000 µL** de «NF- Water» por tubo.
- 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 la utilización, hay 2 soluciones posibles:
 - bien añadir **5 µL de EPC-Ext** en el primer tampón de lisis durante la extracción de ácidos nucleicos con perlas magnéticas o columnas de sílice.
 - bien añadir **0,5 µL de EPC-Ext** en cada pocillo de la PCR (si se utiliza la extracción en lisis directa). Véase "Amplificación", paso 1.

b. Preparación del control CTL+

- Añadir **200 µL** de «NF- Water» 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 cada análisis, utilizar **5 µL** del CTL+ en uno de los pocillos correspondientes (véase el apartado «Amplificación», Etapa 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.

Paso 1:

Si se utiliza el EPC-Ext:

Agregar **10 µL** de solución de amplificación (A6) en cada pocillo.

Si no se utiliza EPC-Ext:

Colocar (n+1) x 10 µL de solución de amplificación (A6) en un microtubo y añadir (n+1) x 0,5 µL de EPC. Agregar **10 µL** de la mezcla en cada pocillo.

Paso 2: Distribuir **5 µL** de los ácidos nucleicos extraídos de las muestras y **5 µL** de los controles en cada pocillo asignado.

Utilizar 5 µL de agua sin nucleasas para el control de 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, para los LightCycler de Roche Diagnostics, para el Rotor-Gene Q de Qiagen, para el CFX96 y Chromo 4 de Biorad, para el MIC de BioMolecular System.

Programa ADN/ARN	
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 leída en el espectro ROX para los dispositivos ABI Prism.

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

H. Interpretación de los resultados

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

1. Validación del ensayo

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

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

*Según la adición o no de EPC-Ext durante la etapa de amplificación

2. 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	Influenza A
No	Sí	No detectado
Sí	Sí	Detectado
Sí	No	Detectado
No	No	No determinado

«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.

Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
	Referencia 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 seco

1 | Extraer los ácidos nucleicos con

**Adia^X
Mag**



Escanearme para
descubrir Adiamag™

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

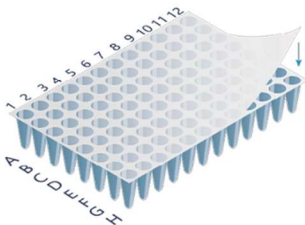


Si utiliza el EPC en la fase de extracción:

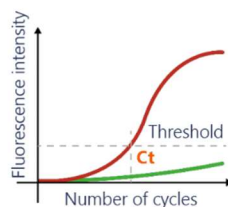
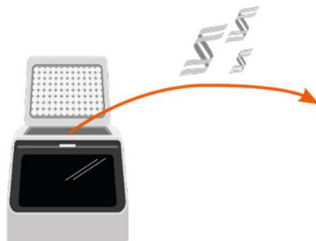
3 | Agregar **10 µL** de solución de
amplificación **A6**

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

5 | Sellar los pozos

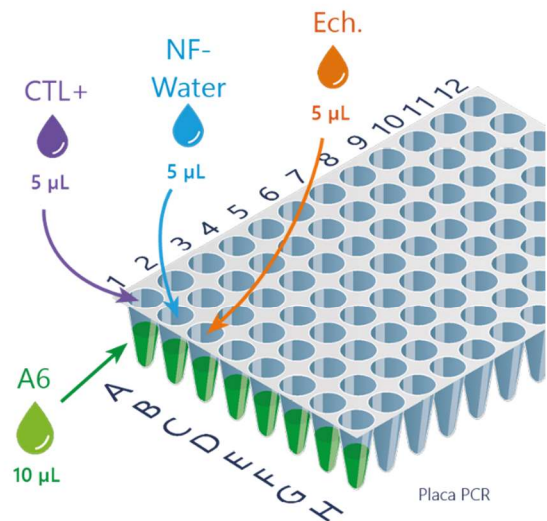


6 | Iniciar el análisis PCR



Si no se utiliza el EPC en la fase de extracción:

3 | Preparar una premezcla de **10 µL**
de solución de amplificación **A6** + **0,5 µL**
de EPC
Añadir **10 µL** de la premezcla



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