



Instrucciones de uso
ADL22Y1-CSFV_NO_(ES)_V01
01/2023

CSFV

Referencia: ADL22Y1-100

Test para la detección del Virus de la Fiebre Porcina Clásica (CSFV) mediante amplificación enzimática en tiempo real
Test PCR – 100 reacciones

Para uso veterinario *in vitro* únicamente



Muestra	Análisis individual	Análisis en mezcla *, posible hasta
Sangre entera, suero, cultivo de células sobrenadantes	✓	20
Tejido (bazo, amígdala, ganglio...)	✓	10

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

Composición del test

Material suministrado		ADL22Y1 Kit 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)
CSFV CTL+	Control positivo CSFV	1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
NF-water	Agua sin nucleasas	1 tubo con tapón blanco de 1000 µL (reactivo listo para usar)

Historial de revisiones

Fecha	Versión	Modificaciones
09/2021	NS22Y1-01	primera versión
01/2023	V01	Cambiar al formato simplificado Adaptación del envase a 100 reacciones

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

A. Introducción

La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad vírica contagiosa de los cerdos domésticos y salvajes. El agente patógeno es un pestivirus relacionado con el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), o virus de la enfermedad de la frontera (BDV). Se trata de un virus ARN.

En su forma aguda, la peste porcina clásica se caracteriza por fiebre alta, pérdida de apetito, trastornos de la coordinación, diarrea y neumonía; la muerte se produce en 1-2 semanas.

Clínicamente, es difícil diferenciar las infecciones debidas al virus de la peste porcina africana (ASFV), de ahí la necesidad de un diagnóstico diferencial de laboratorio. La PCR es una herramienta muy sensible y rápida para la detección del virus de la peste porcina clásica y su diferenciación del virus de la peste porcina africana.

B. Objetivo del test

El test ADIALYO™ CSFV está basado en la transcripción inversa (TI) del ARN en ADN complementario. Después, se procede a la amplificación génica de fragmentos de ADN específicos del CSFV. Detecta simultáneamente en monocúplula:

- CSFV (sonda marcada con FAM)
- GAPDH: Control interno de extracción y amplificación específico de un ácido nucleico endógeno (sonda etiquetada HEX o su equivalente).

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.

Kits complementarios para la adopción del método y PCR

- **LDpcc Positive control CSFV (Ref.: ADC22YLD)**
Confirmación de resultados – LDpcc 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.
- 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 test y referencia
ADIAMAG™ (Bio-X Diagnostics)	Esferas magnéticas	200 test: ref. NADI003 800 test: ref. NADI003-XL
ADIAMAG™ LB3 buffer	Almohadilla magnética (para tela)	125 mL: ref. NADI004
QIAamp® Viral RNA (Qiagen)	Columna de sílice	50 test: ref. 52904 250 test: ref. 52906
NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel)	Columna de sílice	50 test: ref. 740956.50 250 test: ref. 740956.250

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.

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.

Control	Validación de	Procedimiento
Control reactivo (NTC)	ausencia de contaminación para la amplificación	5 µL Agua NF en un pozo por ejecución de PCR
CSFV CTL+	amplificación de la cepa diana de CSFV	5 µL CTL+ 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 _{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», paso 1.

2. 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.
- Se utilizarán **5 µL** «CSFV 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.

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, QuantStudio5, 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	224
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

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 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
CSFV CTL+	Sí	Sí/No	Amplificación de los objetivos CSFV y de control interno
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

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	CSFV
Sí	No	Detectado
No	Sí	No detectado
Sí	Sí	Detectado
No	No	Indeterminado

«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 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

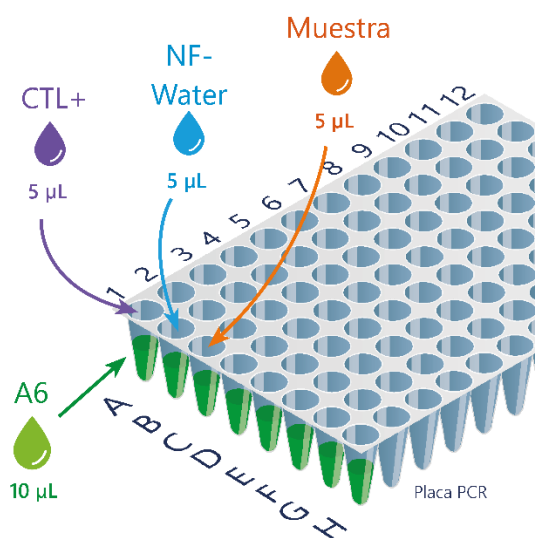


2 | Añadir **1000 µL** de **Rehydration buffer** al solución de amplificación **A6**

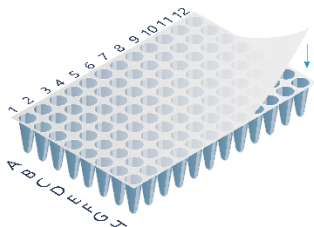


3 | Agregar **10 µL** de solución de amplificación **A6**

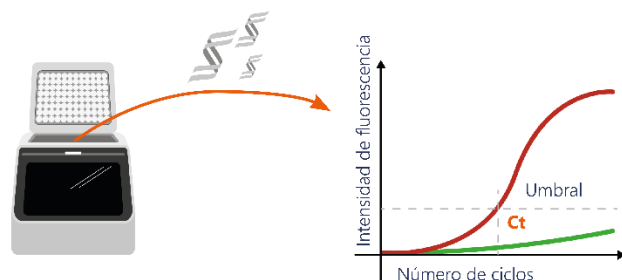
4 | Distribuir **5 µL** de **ácidos nucleicos**, **CTL+** y **NF-Water**



5 | Sellar los pozos



6 | Iniciar el análisis PCR



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