



Instrucciones de uso  
ADL55Y1-ASFV\_NO\_(ES)\_V02  
06/2023

## ASFV

Referencia: ADL55Y1-100 & ADL55Y1-1000

Test para la detección del Virus de la Fiebre Porcina Africana (ASFV) mediante amplificación enzimática en tiempo real  
Test PCR –100 & 1000 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                                 |
| Médula ósea                                            | ✓                   | ✗                                  |
| Frotis de sangre o exudado                             | ✓                   | ✗                                  |

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

## Composición del test

| Material suministrado |                           | ADL55Y1 test                                                  |                                                               |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
|                       |                           | 100 reacciones                                                | 1000 reacciones                                               |
| A6                    | Solución de amplificación | 1 frasco liofilizado (para reconstituir)                      | 10 frascos liofilizado (para reconstituir)                    |
| Rehydration Buffer    | Solución de rehidratación | 1 frasco de 6 mL (reactivo listo para usar)                   | 2 frascos de 6 mL (reactivo listo para usar)                  |
| ASFV CTL+             | Control positivo ASFV     | 1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)                  | 2 tubos con tapón violeta (para reconstituir)                 |
| NF-Water              | Agua sin nucleasas        | 1 tubo con tapón blanco de 1000 µL (reactivo listo para usar) | 1 tubo con tapón blanco de 1000 µL (reactivo listo para usar) |

## Historial de revisiones

| Fecha   | Versión   | Modificaciones                                                                                                                                                                               |
|---------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 06/2021 | NS55Y1-02 | primera versión                                                                                                                                                                              |
| 01/2023 | V01       | Cambiar al formato simplificado<br>Adaptación del envase a 100 reacciones                                                                                                                    |
| 06/2023 | V02       | Adaptación del envase a 1000 reacciones.<br>Adición de un kit complementario. ("Extraction Negative Control ASFV" ref. ADC55ENC: Control interno exógeno para muestras sin células animales) |

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

## A. Introducción

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad hemorrágica muy contagiosa que afecta a cerdos, facóqueros y jabalíes de Europa y América. Todos los grupos de edad son susceptibles a la enfermedad. El patógeno responsable de la PPA es un virus de ADN de doble hélice de la familia Asfarviridae. El virus se transmite entre los suidos a través del contacto directo o por ingestión de productos cárnicos contaminados. Las garrapatas blandas del género Ornithodoros también pueden transmitir el virus, aunque no son necesariamente vectores. En sus formas más virulentas, la peste porcina africana se caracteriza por fiebre alta, pérdida del apetito y hemorragias cutáneas y de los órganos internos. Tras la infección, la muerte suele sobrevenir entre los 2 y los 10 días y la mortalidad puede llegar al 100 %.

La diferenciación clínica de las infecciones causadas por el virus de la peste porcina clásica (VPPC) o el virus de la PPA es difícil. La PCR es una herramienta muy sensible y rápida que permite la detección del VPPA y la diferenciación del VPPC.

## B. Objetivo del test

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

- ASFV (sonda marcada con FAM).
- RNase P: 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

- **Extraction Positive Control ASFV (Ref.: ADC55EPC).** Material de referencia - proveedor para adopción del método que también puede ser utilizado como centinela.
- **Extraction Negative Control ASFV (Ref.: ADC55ENC).** Control interno exógeno para muestras libres (o que contengan una cantidad muy baja) de células animales (muestras ambientales, hueso...).
- **LDpcr Positive control ASFV (Ref.: ADC55YLD)** 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.
- 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™ (Bio-X Diagnostics) | Esferas magnéticas       | 200 tests: ref. NADI003<br>800 tests: ref. NADI003-XL |

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                                                 |
| ASFV CTL+                      | amplificación de la cepa diana de ASFV                          | 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 <sub>Método</sub> ) 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** «ASFV 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 filme 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

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          |
| ASFV CTL+                      | Sí            | Sí                | Amplificación de los objetivos ASFV 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 | ASFV           |
| 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

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



Escanearme para  
descubrir Adiamag™

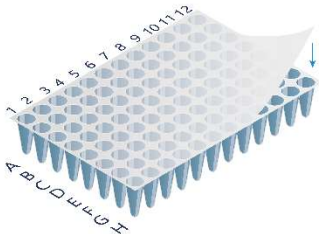
- 2 | Añadir **1000 µL** de **Rehydration buffer**  
al solución de amplificación **A6**



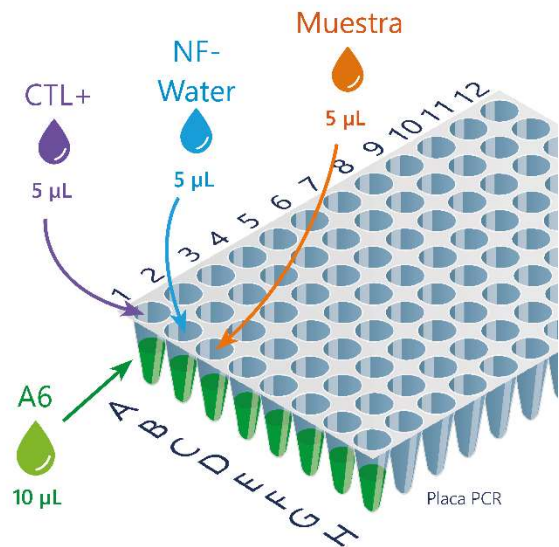
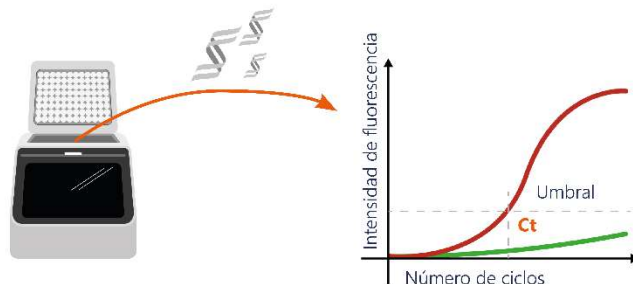
- 3 | Agregar **10 µL** de solución de  
amplificación **A6**

- 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.