



Adia^X Lyo

Instrucciones de uso
ADL13Y1_PRRS_NO_(ES)_V02
25/10/2022

EU/NA PRRSV

Referencia: ADL13Y1-100

Test para la detección, diferenciación y cuantificación del *Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP)* EU y NA por amplificación enzimática del genoma en tiempo real.

Test PCR - 100 reacciones

Uso *in vitro* y estrictamente veterinario



Muestra	Análisis individual	Análisis en mezcla*, posible hasta
Sangre total / Suero	✓	5
Tejido (pulmón, ...)	✓	3
Saliva	✓	3
Fluidos orales / Lavado traqueobronquial	✓	✗

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

Composición del kit

Material suministrado		Kit ADL13Y1-100
		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)
VSRRP EU CTL+	Control positivo <i>VSRRP</i> genotipo EU	1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
VSRRP NA CTL+	Control positivo <i>VSRRP</i> genotipo NA	1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)
Agua NF	Agua sin nucleasas	2 tubos con tapón blanco de 1000 µL (reactivo listo para usar)

Revisión documental

Fecha	Versión	Modificaciones
02/05/2022	V01	Primera versión
04/08/2022	V01	Corrección de la tabla "Programa de ADN/ARN"
25/10/2022	V02	Adaptación del envase a 100 reacciones

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

A. Introducción

El agente responsable del síndrome reproductivo y respiratorio porcino es un virus de ARN de la familia de los Arterivirus. Provoca una de las principales enfermedades que afectan al cerdo y tiene un impacto económico significativo a nivel mundial. El virus se puede dividir en dos clases: VSRRP I (cepas denominadas 'europeas', o EU) y VSRRP II (cepas denominadas 'norteamericanas', o NA) (Adam *et al.*, 2016; Kuhn *et al.*, 2016).

Predominan dos síntomas: trastornos de la reproducción (abortos tardíos, prolongación anormal de la duración de la gestación, mortalidad neonatal elevada, descenso de la fertilidad) y trastornos respiratorios asociados a inapetencia e hipertermia.

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino se observa actualmente en la mayoría de las regiones del mundo donde se crían cerdos. Además de Europa y América del Norte, fue identificado en China en 1995, y está presente en Japón, Vietnam, Filipinas, Malasia y Corea. Australia, Nueva Zelanda, varios países de Europa, algunas partes de África y la India están actualmente libres de la enfermedad (fuente: OIE).

La coexistencia de diferentes genotipos del VSRRP en las pjaras complica la lucha contra las infecciones. La detección rápida, eficaz y práctica de los diferentes genotipos del VSRRP es, por lo tanto, crucial para la gestión de las infecciones. La RT-qPCR cumple todos estos criterios, por lo que constituye un método de elección para la identificación y el control de las infecciones por el VSRRP.

B. Principio del test

El test ADIALYO EU/NA PRRSV 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 VSRRP EU o el VSRRP NA. Detecta simultáneamente en monocúpula:

- VSRRP tipo EU (sonda marcada con FAM)
- VSRRP tipo NA (sonda marcada con Cy5)
- ARNasa P: un control interno de extracción y de amplificación específicas de ADN endógeno (sonda marcada con HEX o equivalente)

Los controles positivos VSRRP EU CTL+ y VSRRP NA CTL+, suministrados en el kit, permiten cuantificar el VSRRP.

C. Condiciones de conservación

Tras su recepción, conservar el kit a +4/8 °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.

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 abrir los tubos PCR tras la amplificación.
- No mezclar reactivos de diferentes lotes.
- 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 suministra 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

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 24 horas antes de la utilización. Para prolongar la conservación, se deberán conservar a una temperatura inferior a -15 °C o -65 °C.

2. Controles a incluir

La utilización de controles permite controlar la fiabilidad de los resultados. Los controles se incluyen por serie de análisis según las recomendaciones definidas por las normas vigentes (véase norma AFNOR U47-600, ...).

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
VSRP EU CTL+ (Dilución pura a 1/10 000)	Amplificación de la cepa diana del VSRP EU y rango de calibración	5 µL de solución VSRP EU CTL+ en un pocillo por serie de PCR
VSRP NA CTL+ (Dilución pura a 1/10 000)	Amplificación de la cepa diana del VSRP NA y rango de calibración	5 µL de solución VSRP NA 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 «**Tampón 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», Fase 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.
- En caso de un test cuantitativo, preparar, antes de la utilización, un rango de referencia con agua sin nucleasas:

Dilución	Concentración del VSRP EU CTL+ (copias/PCR)
Pura	4.10 ⁶
1/10	4.10 ⁵
1/100	4.10 ⁴
1/1000	4.10 ³
1/10000	4.10 ²

Dilución	Concentración del VSRP NA CTL+ (copias/PCR)
Pura	2.10 ⁶
1/10	2.10 ⁵
1/100	2.10 ⁴
1/1000	2.10 ³
1/10000	2.10 ²

- Utilizar **5 µL** de cada dilución en los pocillos asignados (consultar el apartado «Amplificación», Fase 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: Repartir **10 µL** de reactivo de amplificación A6 en cada pocillo de PCR

Paso 2: Distribuir **5 µL** de los ácidos nucleicos extraídos de las muestras y **5 µL** de los controles en cada pocillo asignado. Utilizar el 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	530	549
Cy5	646	662
ROX	575	602

Nota: el Quencher no es fluorescente. La mezcla contiene una referencia pasiva leída en el espectro de ROX para los dispositivos ABI.

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

H. 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.

Controles	Amplificación			Validación de
	FAM	Cy5	HEX o equivalente	
Control reactivo (NTC)	No	No	No	Ausencia de contaminación para la amplificación
VSRRP EU CTL+	Sí	No	No	Amplificación de la cepa diana del VSRRP EU
VSRRP NA CTL+	No	Sí	No	Amplificación de la cepa diana del VSRRP NA
Control negativo de extracción	No	No	No	Ausencia de contaminación para la extracción
Control positivo de extracción del VSRRP EU	Sí	No	Sí	Fases de extracción y de amplificación del VSRRP EU
Control positivo de extracción del VSRRP NA	Sí	No	Sí	Fases de extracción y de amplificación del VSRRP NA

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, Cy5 o HEX o equivalente.

Amplificación			Interpretación	
FAM	Cy5	HEX o equivalente	VSRRP EU	VSRRP NA
No	No	Sí	No detectado	No detectado
Sí	Sí	Sí	Detectado	Detectado
Sí	No	Sí	Detectado	No detectado
No	Sí	Sí	No detectado	Detectado
No	No	No	No determinado	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.

2. Validación e interpretación de los resultados cuantitativos

a. Rango de calibración

Dilución del VSRRP EU CTL+	Concentración (copias/PCR)	Amplificación FAM	Validación de
Pura	4.10 ⁶	Sí	Amplificación de la cepa diana del VSRRP EU y de la recta de calibración
1/10	4.10 ⁵	Sí	
1/100	4.10 ⁴	Sí	
1/1 000	4.10 ³	Sí	
1/10 000	4.10 ²	Sí	

Dilución del VSRRP NA CTL+	Concentración (copias/PCR)	Amplificación Cy5	Validación de
Pura	2.10 ⁶	Sí	Amplificación de la cepa diana del VSRRP NA y de la recta de calibración
1/10	2.10 ⁵	Sí	
1/100	2.10 ⁴	Sí	
1/1 000	2.10 ³	Sí	
1/10 000	2.10 ²	Sí	

Para la interpretación cuantitativa de los resultados, establecer una recta de calibración (número de ciclos = f (log concentración)), calcular la ecuación de la recta ($y = ax + b$) y verificar 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^2 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 del VSRRP EU o VSRRP NA	Estado de la muestra para el VSRRP EU o VSRRP NA
Ninguna señal	No detectado Ácido nucleico no detectado
Señal < LC _{MÉTODO}	Detectado Ácido nucleico detectado en cantidad inferior a LC _{MÉTODO}
LC _{MÉTODO} < señal < LC _{máx.}	Detectado Ácido nucleico cuantificable
Señal > LC _{máx.}	Detectado Ácido nucleico detectado en cantidad superior a LC _{máx.}

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

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

Donde x: concentración (en copias/PCR si se omite F)
y: valor de Ct en FAM o Cy5 de la muestra positiva a cuantificar
b: ordenada de origen de la recta
a: pendiente de la recta
F: factor multiplicador (opcional)

El factor multiplicador se determina según la matriz de la muestra y el método de extracción y permite la conversión de la cuantificación de copias/PCR a copias/mL o copias/mg.

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

Referencias bibliográficas

- M.J. Adams, E.J. Lefkowitz, A.M. Q. King, B. Harrach, R.L. Harrison, N.J. Knowles, A.M. Kropinski, M. Krupovic, J.H. Kuhn, A.R. Mushegian, M. Nibert, S. Sabanadzovic, H. Sanfaçon, S.G. Siddell, P. Simmonds, A. Varsani, F.M. Zerbini, A.E. Gorbalenya, A.J. Davison (2016). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). Arch Virol. 161:2921-2949.
- J.H. Kuhn, M. Lauck, A.L. Bailey, A.M. Shchetinin, T.V. Vishnevskaya, Y. Bào, T. Fei Fan Ng, M. LeBreton, B.S. Schneider, A. Gillis, U. Tamoufe, J. Le Doux Diffo, J.M. Takuo, N.O. Kondov, L.L. Coffey, N.D. Wolfe, E. Delwart, A.N. Clawson, E. Postnikova, L. Bollinger, M.G. Lackemeyer, S.R. Radoshitzky, G. Palacios, J. Wada, Z.V. Shevtsova, P.B. Jahrling, B.A. Lapin, P.G. Deriabin, M. Dunowska, S.V. Alkhovsky, J. Rogers, T.C. Friedrich, D.H. O'Connor, T.L. Goldberg (2016). Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. Arch Virol. 161:755-768.

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 seco

- 1 | Extraer los ácidos nucleicos con

Adia^X
Mag



Escanearme para
descubrir Adiamag™

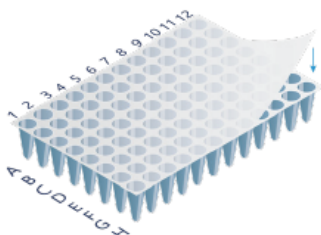
- 2 | Añadir **1000 µL** de **Rehydration buffer**
al solución de amplificación **A6**



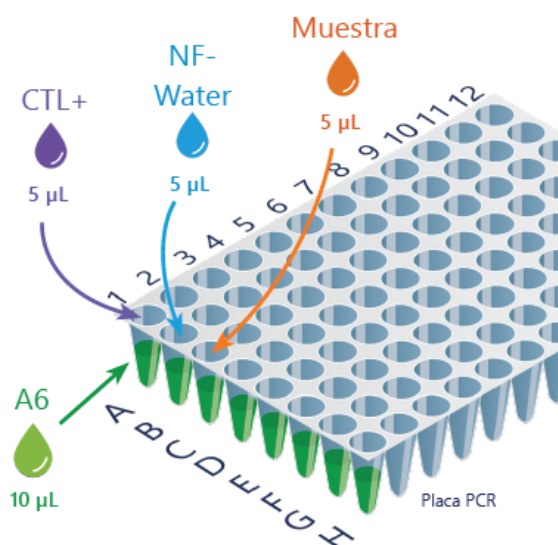
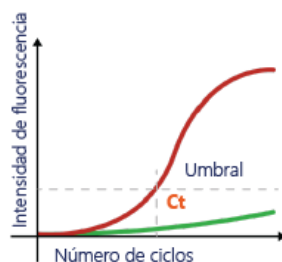
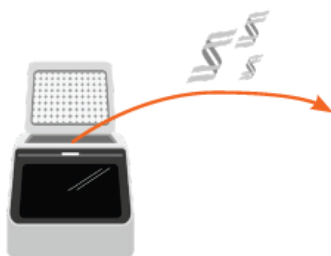
- 3 | Agregar **10 µL** de solución de
amplificación **A6**

- 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.