



Adia^X Vet

Instrucciones de uso
ADI721-EHDV_NO_(ES)_V01
11/2023

EHDV REAL TIME

Referencias: ADI721-100 & ADI721-500

Test para la detección del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (VEHE o EHDV, *Epizootic haemorrhagic disease Virus*) por amplificación enzimática del gen en tiempo real.

Prueba PCR – 100 & 500 reacciones

Uso *in vitro* y estrictamente veterinario



Muestra	Análisis individual	Análisis en mezcla*
Sangre	✓	✓
Órgano (bazo y tejidos de abortón)	✓	✓

*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 ADI721-100	Kit ADI721-500
		100 reacciones	500 reacciones
A5	Solución de amplificación	2 tubos con tapón verde de 1000 µl (reactivo listo para usar)	10 tubos con tapón verde de 1000 µl (reactivo listo para usar)
EHDV CTL+	Control positivo VEHE	1 tubo con tapón violeta (para reconstituir)	2 tubos con tapón violeta (para reconstituir)
NF-Water	Agua sin nucleasas	1 tubos con tapón blanco de 1000 µl (reactivo listo para usar)	1 tubos con tapón blanco de 1000 µl (reactivo listo para usar)

Historial de revisiones

Fecha	Versión	Modificaciones
11/2023	V01	Creación

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

Smart solutions for sharp decisions

A. Introducción

Descubierto por primera vez en Estados Unidos en 1955, el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHE o Haemorrhagic Disease: EHD en inglés) afecta principalmente a bovinos y cérvidos. Existen siete serotipos diferentes del virus.

El virus se transmite por la picadura de unas pequeños mosquitos del género *Culicoides*. En los bovinos, los signos clínicos de la EHE son muy similares a los de la fiebre catarral ovina (LA) y se manifiestan en forma de fiebre, anorexia, cojera, insuficiencia respiratoria y potencialmente, la muerte del animal. Los pequeños rumiantes también pueden ser portadores del virus.

La detección precoz del virus mediante RT-PCR permite limitar la propagación de la enfermedad antes del traslado de los animales hacia otras regiones o países.

B. Principio de la prueba

El test ADIAVET™ EHDV REAL TIME está basado en la transcripción inversa (TI) del ARN del virus a ADN complementario. Esta reacción se continúa con la amplificación génica de fragmentos de ADN específicos del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica. Detecta simultáneamente en monocúpula:

- Virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (sonda marcada en FAM).
- GAPDH: un control interno de extracción y de amplificación específica de ADN endógeno (sonda marcada con HEX o equivalente).

C. Condiciones de conservación

Tras su recepción, el kit se debe conservar a <-15 °C hasta la fecha de caducidad.

Se recomienda alicuotar el reactivo "A5" si el número de análisis a realizar requiere más de tres descongelaciones.

No descongelar más de 3 veces.

Conservar protegido de la luz.

No mezclar reactivos de diferentes lotes.

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 de método y PCR (U47-600)

■ **Extraction Positive Control EHDV (Ref.: ADC72EPC).**
Material de referencia - proveedor para adopción del método que también puede ser utilizado como centinela (Calibrado entre 1 y 100xLD_{Método}).

■ **LD_{PCR} Positive Control - EHDV (Ref.: ADC72LD)**
Confirmación del rendimiento - LD_{PCR} 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

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.

Los protocolos de extracción validados están descritos en el informe de validación del kit. 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 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 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 NF-Water en un pocillo por serie de PCR
EHDV CTL+	Amplificación de la cepa diana	5 µl CTL+ en un pocillo por serie 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	Pasos de extracción y de amplificación	1 extracción (Muestra positiva entre 1 y 100x LD _{Método}) por serie de extracción

G. Procedimiento

1. 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 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 cada análisis, utilizar **5 µl** del CTL+ en uno de los pocillos correspondientes (véase el apartado «Amplificación», Etapa 2).

2. Desnaturalización de los ácidos nucleicos

- Para cada muestra extraída y para cada control, transferir un mínimo de 10 µl de ácidos nucleicos en un tubo o placa 96 y conservar el resto a una temperatura inferior a -15 °C o -65 °C.
- Incubar 3 minutos a +95 °C en un termociclador o bloque calefactor.
- Colocar inmediatamente los tubos o la placa 96 sobre hielo o un bloque refrigerante hasta su utilización (evitar la renaturalización del ARN).
- Para información sobre la utilización, 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 **20 µl** de reactivo de amplificación A5 en cada pocillo de PCR.

Paso 2: Distribuir **5 µl** de los ácidos nucleicos extraídos desnaturalizados y **5 µl** de los controles desnaturalizados 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.

Los programas siguientes han sido desarrollados para los dispositivos ABI Prism (tipo 7500, QuantStudio5, 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 ARN estándar		Programa ARN FAST	
10 min. 45 °C		10 min 45 °C	
10 min. 95 °C		10 min 95 °C	
15 s 95 °C**	40 ciclos	5 s 95 °C	40 ciclos
60 s 60 °C*		30 s 60 °C*	

**30 s 95 °C para MX3000 y MX3005P

* Lectura y parámetros para la adquisición de la fluorescencia:

Fluorocromo	Absorbancia (nm)	Emisión (nm)
FAM	494	520
HEX o equivalente	530	549
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	Ausencia de contaminación para la amplificación
EHDV CTL+	Sí	No/Sí	Amplificación de la cepa diana
Control negativo de extracción	No	No	Ausencia de contaminación para la extracción
Control positivo de extracción	Sí	No/Sí	Pasos 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	VEHE
No	Sí Ct < 33	No detectado
Sí, Ct < 34	Sí	Detectado
Sí, 34 ≤ Ct < 40	Sí	Detectado en poca cantidad
No	No/Sí Ct ≥ 33	No determinado

«**Detectado en poca cantidad**»: El estado de la infección no se puede definir: infección muy reciente (inicio de la viremia) o antigua (fin de la viremia).

«**Indeterminado**»: Los resultados no se pueden interpretar para la muestra correspondiente.

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 1/5 en agua sin nucleasas;

Si los resultados del test siguen siendo inválidos, volver a realizar la extracción de los ácidos nucleicos y diluir la sangre al 50 % en tampón PBS. Finalmente, si no se consigue un resultado interpretable, la muestra es inservible (presencia de inhibidores de RT-PCR; muestra lisada o descompuesta...).

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

1 | Extraer los ácidos nucleicos con

**Adia^X
Mag**

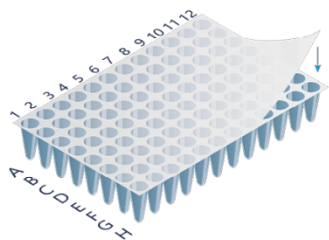


Escanearme para
descubrir Adiamag™

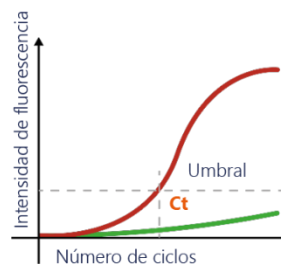
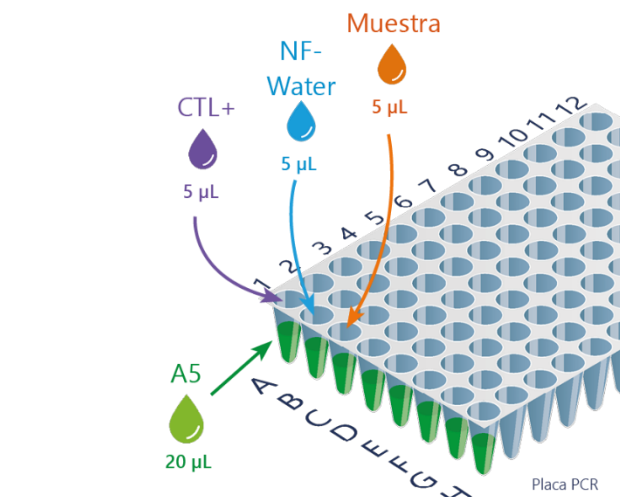
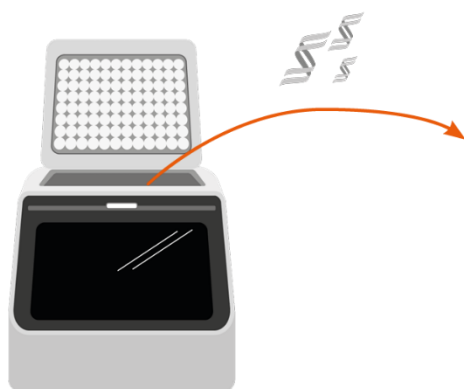
2 | Agregar **20 µL** de solución de
amplificación **A5**

3 | Distribuir **5 µL de ácidos nucleicos***,
CTL+* y **NF-Water**
*Desnaturalizado 3 min. a 95 °C

4 | Sellar los pozos



5 | Iniciar el análisis PCR



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