



Manual de usuario
ADL73Y1-ORBI_NO_(ES)_V01
09/2024

BTV/EHDV

Número de pieza: ADL73Y1-100 y ADL73Y1-500

Prueba para la detección del virus de la lengua azul (BTV) y el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHDV) mediante amplificación enzimática de genes en tiempo real

Prueba PCR -100 y 500 reacciones

Uso *in vitro* y estrictamente veterinario



Muestra	Análisis individual	Análisis mixto*, posible hasta
Sangre	✓	✓
Órgano	✓	✓

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

Composición del kit

Equipos suministrados		Kit ADL73Y1	
		100 reacciones	500 reacciones
A6	Solution d'amplification	1 vial liofilizado (para reconstituir)	5 viales liofilizados (Para reconstituir)
Rehydration buffer	Solución de rehidratación	1 vial de 6 ml (reactivo listo para usar)	1 vial de 6 ml (reactivo listo para usar)
BTV CTL+	Control positivo de BTV	1 tubo con tapón morado (para reconstituir)	2 tubos de tapa morada (a reconstituir)
EHDV CTL+	Control positivo de EHDV	1 tubo con tapón morado (para reconstituir)	2 tubos de tapa morada (a reconstituir)
NF-Water	Agua Libre de Nucleasas	1 tubo de tapón blanco de 1000 µL (Reactivo listo para usar)	2 tubos de tapón blanco de 1000 µL (Reactivo listo para usar)

Historial de revisiones

Fecha	Versión	Modificaciones
07/2024	V01	Creación

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

A. Introducción

La fiebre catarral ovina (o Lengua Azul) es una enfermedad viral infecciosa no contagiosa debida a un Orbivirus (familia Reoviridae, virus ARN) vectorizado por artrópodos, principalmente moscas chupadoras de sangre del género *Culicoides*. Hay más de 30 serotipos distintos que inducen una protección parcial o ninguna protección cruzada entre ellos. También se ha descrito la transmisión por transferencia embrionaria en ovejas gestantes. La transmisión por inyección de sangre contaminada puede ser posible a través de la reutilización de agujas y jeringas. Las muestras de elección para la detección del virus son la sangre de animales febriles tomada con anticoagulante (EDTA). La presencia del virus se demuestra mediante aislamiento a partir de óvulos embrionados, cultivo celular *in vitro*, inmunofluorescencia en un monocapa celular infectada o por PCR. Descubierto por primera vez en los Estados Unidos en 1955, el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHE) afecta principalmente al ganado y a los cérvidos. Hay siete serotipos diferentes del virus. El virus también se transmite por picaduras de mosquitos del género *Culicoides*. En el ganado bovino, los signos clínicos del EHE son similares a los de la fiebre catarral ovina (FCO) y provocan fiebre, anorexia, cojera, dificultad respiratoria y, potencialmente, la muerte. Los pequeños rumiantes también pueden ser portadores del virus. La detección temprana de estos virus mediante RT-PCR ayuda a limitar la propagación de enfermedades causadas antes del movimiento de animales a otras regiones o países.

B. Principio de la prueba

La prueba ADIALYO™ BTV/EHDV se basa en la transcripción inversa (RT) de ARN en ADN complementario. A esta reacción le sigue la amplificación génica de fragmentos de ADN específicos del virus de la lengua azul (BTV) y del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHE). El Detecta simultáneamente en un pocillo:

- BTV (sonda etiquetada con FAM).
- EHDV (sonda etiquetada HEX o equivalente).
- GAPDH: control interno para la extracción y amplificación específica de ADN endógeno (sonda marcada con Cy5).

C. Condiciones de almacenamiento

Una vez recibido, guarde el kit a +2/8 °C y séquelo. Los reactivos reconstituidos deben dividirse en alícuotas y almacenarse a una temperatura inferior a -15 °C, manteniéndose así hasta la fecha de caducidad del kit. Almacenar lejos de la luz. No descongele más de 3 veces.

D. Material suplementario y reactivos adicionales requeridos no incluidos

- Termociclador con su consumible para PCR en tiempo real.
- Aparato de homogeneización para tubos.
- Pipetas de 1 - 10 µL, 20 - 200 µL y 200 - 1000 µL.
- Puntas sin nucleasas con filtros de micropipeta.
- Microtubos de 1,5 mL y 2 mL sin nucleasa.
- Guantes de látex o nitrilo sin polvo.
- Agua libre de nucleasas.
- Kit de extracción de ácidos nucleicos.

Kits Complementarios para la Adopción de Métodos y PCR (U47-600)

- **Extracción Control Positivo BTV (Ref.: ADC35EPC) y EHDV (Ref.: ADC72EPC).** Material de referencia del proveedor para la adopción de métodos que también se puede utilizar como centinela (calibrado entre 1 y 100xLDMéthode).
- **LDpcr Control Positivo – BTV/EHDV (Ref. ADC73LD)** Confirmación de rendimiento – LDpcr del kit.

E. Precauciones de uso y seguridad

- Solo para uso veterinario *in vitro*.
- Solo para uso en animales.
- Solo para uso profesional.
- Lea todo el protocolo antes de comenzar y sígalo cuidadosamente.
- No utilice reactivos después de la fecha de caducidad del kit.
- No utilice reactivos con el embalaje deteriorado.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes.
- No abra los tubos de PCR después de la amplificación.
- Deseche los equipos utilizados de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección del medio ambiente y gestión de residuos biológicos.
- Este estuche contiene componentes de origen animal. El control del origen y/o del estado sanitario de los animales no puede garantizar de manera absoluta que estos productos no contengan ningún agente patógeno transmisible, por lo que se recomienda manipularlos con las precauciones habituales para productos potencialmente infecciosos (no ingerir; no inhalar).

F. Extracción de ácidos nucleicos

1. Kits de extracción

Los ácidos nucleicos deben extraerse de las muestras antes de usar el kit. Los kits de extracción de ADN/ARN que se enumeran a continuación son recomendados y proporcionados por Bio-X Diagnostics:

Nombre del producto	Tecnología de extracción	Número de pruebas y referencia
ADIAMAG™	Bolas magnéticas	200 pruebas: ref. NADI003 800 pruebas: ref. NADI003-XL

Para la extracción, consulte la versión del prospecto disponible en el sitio web, indicada en el certificado de análisis incluido en el kit de PCR utilizado.

Se pueden utilizar otros kits de extracción después de la validación del usuario.

Después de la extracción, los ácidos nucleicos extraídos pueden almacenarse a +2/8 °C durante unas horas antes de su uso. Para un almacenamiento más prolongado, deben almacenarse a una temperatura inferior a -15 °C o -65 °C.

2. Testigos

El uso de testigos permite comprobar la fiabilidad de los resultados. Los testigos se incluyen por serie de análisis de acuerdo con las recomendaciones definidas por las normas vigentes (Cf. AFNOR U47-600, etc.).

Controles	Validación de	Procedimiento
Luz indicadora (NTC)	Libre de contaminación para amplificación	5 µL de agua NF en un pozo según la serie de PCR
BTV CTL+	Amplificación de objetivos BTV	5 µL BTV CTL+ en un pocillo por serie de PCR
EHDV CTL+	Amplificación de objetivos EHDV	5 µL de EHDV CTL+ en un pocillo por serie de PCR
Control de extracción negativa	Libre de contaminación para extracción y amplificación	1 extracción (tampón de agua o lisis) por serie de extracción
Control positivo de extracción	Etapas de extracción y amplificación	1 extracción (muestra positiva entre 1 y 100X LD _{Method}) 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 con un agitador tipo vórtice > 20 segundos.
- Después de la reconstitución, alícuote y almacene la solución a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit. No descongele más de 3 veces.
- Para su uso, consulte el § "Amplificación", Paso 1.

2. Preparación de CTL+

- Añadir **200 µL** de "NF-Water" por tubo.
- Homogeneizar el tubo por succión y luego usando un agitador de vórtice > 20 segundos hasta que la base azul se disuelva por completo.
- Después de la reconstitución, alícuote la solución y almacene la solución a una temperatura inferior a -15 °C hasta la fecha de caducidad del kit. No descongele más de 3 veces.
- Para cada análisis, utilice **5 µL** de CTL+ en uno de los pocillos dedicados (consulte el § "Amplificación", Paso 2).

3. Desnaturalización de ácidos nucleicos

- Por cada muestra extraída y controlada, transfiera 10 µL de ácidos nucleicos a un tubo o placa de 96 y almacene el resto a una temperatura inferior a -15 °C o -65 °C.
- Incubar durante 3 minutos a +95 °C en un termociclador o bloque calefactor.
- Transfiera inmediatamente los tubos o la placa-96 en hielo o bolsa de hielo hasta que esté listo para usar (evite la renaturalización del ARN).
- Para su uso, consulte el § "Amplificación", Paso 2.

4. Amplificación

Atención:

- Antes de comenzar, descongele los reactivos a temperatura ambiente y lejos de la luz.
- Homogeneizar todos los reactivos y muestras antes de su uso.
- Ponga los reactivos a una temperatura inferior a -15 °C después de la distribución.

Paso 1: Distribuya **10 µL** de reactivo de amplificación A6 en cada pocillo de PCR.

Paso 2: Distribuya **5 µL** de ácidos nucleicos desnaturalizados extraídos de las muestras y **5 µL** de controles desnaturalizados en cada pocillo dedicado. Utilice 5 µL de NF-Water para el control reactivo.

Paso 3: Cierre los pozos con una película o tiras adecuadas.

Paso 4: Iniciar el análisis de PCR.

El siguiente programa ha sido desarrollado para los dispositivos ABI Prism de Applied Biosystems (tipo 7500, QuantStudio5, Step-one, etc.), para los Mx3000 y Mx3005P de Agilent, AriaMx, para el LightCycler de Roche Diagnostics, para el Rotor-Gene Q de Qiagen, para el CFX96 y el 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*	

También se ha validado el siguiente programa, compatible con los kits ADIAVET™ BTV TIPO 1 REAL TIME (ADI391), BTV TIPO 3 REAL TIME (ADI711), BTV TIPO 4 REAL TIME (ADI541) y BTV TIPO 8 REAL TIME (ADI381):

Programa ARN FAST	
10 min. 45 °C	
10 min. 95 °C	
5 seg. 95 °C	40 ciclos
30 seg. 60 °C*	

*Lectura y parámetros para la adquisición de fluorescencia:

Fluorocromo	Absorbancia (nm)	Emisión (nm)
FAM	494	520
HEXADECIMAL o equivalente	538	554
Cy5	646	662
ROX	575	602

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

Póngase en contacto con su representante de ventas o servicio al cliente para cualquier otro modelo de termociclador.

H. Interpretación de los resultados

Visualice todas las curvas y coloque la línea de umbral para cada fluorocromo.

1. Validación de la prueba

La amplificación es válida si se obtienen los siguientes resultados. Los valores indicativos esperados de Ct (Threshold Cycle) para los CTL+ se indican en el certificado de análisis del kit.

Controles	Amplificación			Validación de
	FAM	HEX o equivalente	Cy5	
Luz indicadora (NTC)	No	No	No	Libre de contaminación para amplificación
BTV CTL+	Sí	No	Sí/No	Amplificación de objetivos BTV
EHDV CTL+	No	Sí	Sí/No	Amplificación de objetivos EHDV
Control de extracción negativa	No	No	No	Sin contaminación para la extracción
Control positivo de extracción BTV	Sí	No	Sí/No	Pasos para la extracción y amplificación del objetivo BTV
Control positivo de extracción de EHDV	No	Sí	Sí/No	Pasos para extraer y amplificar el objetivo EHDV

2. Interpretación de los resultados

La extracción y amplificación de ácidos nucleicos son **válidas** para cada muestra si se observa al menos una curva de amplificación característica en FAM, Cy5 y/o HEX o equivalente.

Amplificación			Interpretación	
FAM	HEX o equivalente	Cy5	BTV	EHDV
No	No	Sí Ct < 33	No detectado	No detectado
Sí Ct < 34	Sí Ct < 34	Sí	Detectado	Detectado
Sí Ct < 34	No	Sí	Detectado	No detectado
No	Sí Ct < 34	Sí	No detectado	Detectado
Sí 34 ≤ Ct < 40	Sí 34 ≤ Ct < 40	Sí	Detectado en bajas cantidades	Detectado en bajas cantidades
Sí 34 ≤ Ct < 40	No	Sí	Detectado en bajas cantidades	No detectado
No	Sí 34 ≤ Ct < 40	Sí	No detectado	Detectado en bajas cantidades
No	No	No/Sí Ct ≥ 33	No determinado	No determinado

"Detectado en pequeñas cantidades": No se puede definir el estado de la infección: infección muy reciente (inicio de viremia) o infección antigua (fin de viremia).

"No determinado": ausencia de una curva de amplificación característica.

Posibles causas:

PCR defectuosa (presencia de inhibidores, error de programa, muestra sin muestra o demasiado degradada) y/o

Deficiencia en la extracción de ácidos nucleicos (pérdida o destrucción de ácidos nucleicos).

Acciones recomendadas:

Vuelva a hacer la PCR con el extracto puro de ácido nucleico y diluya 1/5 en agua sin nucleasas;

Si la prueba aún no es válida, repita la extracción de ácido nucleico diluyendo la sangre a la mitad en PBS 1X. Por último, si ningún resultado es interpretable, la muestra es inservible (presencia de inhibidores de RT-PCR; muestra lisada o putrefacta, etc.).

Tabla de símbolos

Símbolo	Significación
	Número de catálogo
	Fabricante
	Límite superior de temperatura
	Utilice hasta
	Código de lote
	Ver instrucciones de uso
	Contenido suficiente para "n" pruebas
	Solo para uso veterinario <i>in vitro</i> : solo para uso animal
	Almacenar lejos de la luz
	Almacenar 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**

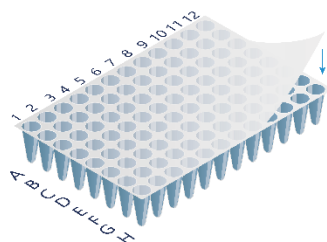


3 | Agregar **10 µL** de solución de
amplificación **A6**

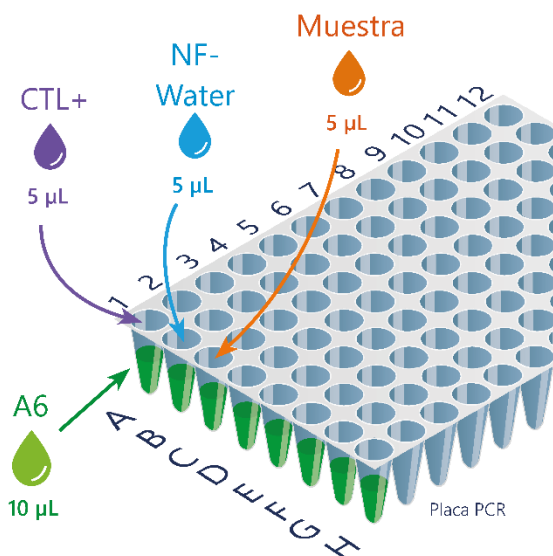
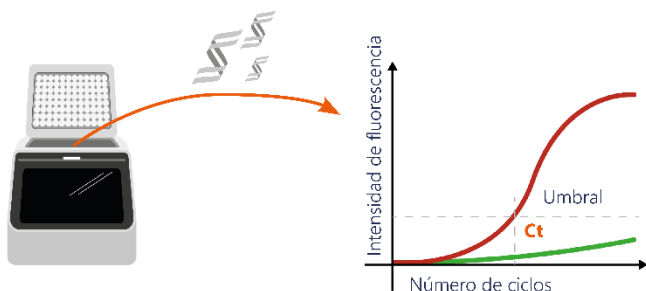
4 | Distribuir **5 µL** de **ácidos nucleicos***,
CTL+ y **NF-Water**

*Desnaturalizado previamente 3 min. 95°C

5 | Sellar los pozos



6 | Iniciar el análisis PCR



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