


# VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit

PCR en tiempo real TaqMan® para la detección del virus de la peste porcina africana

Número de catálogo A28809

N.º de documento 100086703 N.º de pub. MAN0018204 Rev. B.0

Tecnología	Especie	Muestras	Tipo de prueba
PCR en tiempo real (ADN) • Ensayo doble • IPC exógeno	Porcina	Sangre	Individual
		Suero	Mezcla de muestras (5 o 10 muestras)
		Tejidos	Individual

 **¡ADVERTENCIA!** Lea las hojas de datos de seguridad (HDS o SDS) y siga las instrucciones de manipulación. Lleve el equipo de protección individual (EPI) adecuado (gafas, ropa, y guantes). Las hojas de datos de seguridad (HDS o SDS) se encuentran disponibles en [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

## Descripción del producto

El Applied Biosystems™ VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit (Cat. No. A28809) permite detectar el virus de la peste porcina africana (ASFV) en sangre, suero o tejidos porcinos mediante la amplificación por PCR en tiempo real del gen ASFV P72.

El ensayo es un proceso de PCR en tiempo real de pocillo único en el que las dianas del ASFV y el control positivo interno (IPC) exógeno se amplifican y detectan mediante sondas fluorescentes TaqMan®.

El kit incluye:

- 3 - Mix ASFV: Contiene cebadores, sondas TaqMan®, buffer y enzimas para la amplificación por PCR en tiempo real duplex optimizada de las dianas ASFV e IPC.
- 4a - EPC ASFV: Plantilla de ácido nucleico para amplificar la diana P72. Sirve como control positivo externo de la reacción de la PCR en tiempo real y se utiliza para definir el umbral del ciclo (C<sub>t</sub>) para evaluar los resultados de las pruebas.
- 5 - IPC ASFV: Control positivo interno que se añade a cada muestra y cada control en la fase de lisis del procedimiento de extracción de ADN. Sirve como control para el proceso de purificación del ADN y se utiliza para vigilar la presencia de inhibidores de la PCR.

## Componentes y conservación

Componente	Cantidad <sup>[1]</sup>	Conservación <sup>[2]</sup>
3 - Mix ASFV	2 × 1000 µL	-30 °C a -10 °C
4a - EPC ASFV	2 × 90 µL	
5 - IPC ASFV	1 × 500 µL	

<sup>[1]</sup> Suficiente para 100 reacciones de PCR de 25 µL en tiempo real.

<sup>[2]</sup> Consulte la fecha de caducidad en el envase.

## Materiales necesarios no suministrados

A menos que se indique lo contrario, todos los materiales están disponibles en [thermofisher.com](http://thermofisher.com). MLS (Major Laboratory Supplier) (proveedor principal de productos de laboratorio): Fisher Scientific ([fisherscientific.com](http://fisherscientific.com)) u otro proveedor principal de productos de laboratorio.

Artículo	Origen
Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System	Póngase en contacto con su oficina de ventas local.
Placa de 96 pocillos, tiras de tubos (de 8 o 12 pocillos), microtubos o capilares compatibles con el termociclador utilizado	MLS
Pipetas sin nucleasa y puntas de pipeta con filtro	MLS
Dos cestillos con hielo o racks refrigerados: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Uno para el área de preparación de la PCR en el que se prepara la mezcla maestra para la PCR</li> <li>• Otro para la zona donde se preparan las muestras de ADN y los controles</li> </ul>	MLS
Cubiertas o tapas para placas compatibles con placas, tiras de tubos, microtubos o capilares	MLS
Tubos de reactivos sin nucleasa para la preparación de mezclas maestras	MLS
Agua sin nucleasas (no tratada con DEPC)	AM9939
Buffer TE 1X	MLS

## Directrices de procedimiento

- En cada proceso de PCR en tiempo real, incluya los controles indicados en "Preparación de las reacciones de la PCR" en la página 2.
- Siga las "Buenas prácticas de laboratorio para PCR y RT-PCR" en la página 4 para evitar falsos positivos y la contaminación de muestras de prueba con productos de PCR.

## Requisitos para el ADN de entrada

Se recomienda utilizar el MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit (Cat. No. 4462359) para extraer ADN de muestras biológicas, pero también se pueden utilizar otros métodos de extracción del ADN de alta calidad tras realizar la validación adecuada en el laboratorio. Además, prepare una muestra de control de purificación con agua sin nucleasa como material inicial y siguiendo el mismo método de aislamiento del ADN utilizado para las muestras de prueba.

**¡IMPORTANTE!** Añada 5 µL de 5 - IPC ASFV a la solución de lisis empleada para aislar el ADN de cada muestra y control de extracción.

## Antes de empezar

1. Descongele los reactivos y las muestras:
  - a. Descongele 3 – Mix ASFV en un cestillo de hielo o un rack refrigerado.
  - b. Descongele 4a – EPC ASFV, 5 – IPC ASFV y las muestras de ADN en un cestillo de hielo o rack refrigerado aparte.
2. Mezcle completamente el contenido de cada tubo agitando y centrifugue brevemente.

Conserve los reactivos, controles y muestras congelados a 2–8 °C hasta su uso.

## Preparación de las reacciones de la PCR

1. Dispense 20 µL de 3 – Mix ASFV en el número necesario de pocillos de placa PCR, tiras de tubos o capilares.
2. Añada muestra o control de acuerdo con la tabla siguiente:

Tipo de muestra	Componente	Volumen por reacción
Muestra a analizar	ADN de muestra	5,0 µL
Control positivo	4a – EPC ASFV	5,0 µL
Control de extracción	Muestra de control de purificación	5,0 µL
Sin control de plantilla (NTC)	Agua sin nucleasas	5,0 µL

3. Selle cada placa o tubo, mezcle y, a continuación, centrifugue brevemente para que el contenido llegue al fondo de los pocillos de la placa o los tubos.

## Preparar e iniciar el instrumento de PCR en tiempo real

1. Siguiendo las instrucciones del fabricante, configure el proceso de PCR en tiempo real utilizando los siguientes parámetros:

- Volumen de reacción: 25 µL
- Referencia pasiva: colorante ROX™ (incluido en 3 – Mix ASFV)

**Nota:** El colorante ROX™ debe seleccionarse en el instrumento si consigue detectarlo. Pueden usarse instrumentos de PCR en tiempo real que no detecten el colorante ROX™ sin que esto afecte a la precisión de la lectura.

- Seleccione detectores y asigne colorantes y quenchers reporteros TaqMan® a cada pocillo, tubo o capilar utilizado en el análisis.

Diana	Reportero	Quencher
ASFV	colorante FAM™	Quencher no fluorescente (NFQ)
IPC	colorante VIC™	colorante TAMRA™ <sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup> El colorante TAMRA™ debe configurarse para el análisis de PCR en tiempo real si el instrumento consigue detectarlo. Pueden usarse instrumentos de PCR en tiempo real que no detecten el colorante TAMRA™ sin que esto afecte a la precisión de la lectura.

- Programa de termociclado:

Etapas	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	50 °C	2 minutos
2	1	95 °C	10 minutos
3	45	95 °C	15 segundos
		60 °C	1 minuto

2. Ejecute el programa de termociclador recopilando datos de amplificación en tiempo real durante la etapa 3.

## Directrices para el análisis de datos

- Siga la guía de usuario del instrumento para realizar los análisis de datos brutos.
- Defina los umbrales para cada diana por separado.
- Interprete los resultados de cada control y muestra de acuerdo con los valores de  $C_t$  obtenidos según se indica en las secciones siguientes.

### Criterios de validación

Consulte los valores  $C_{tQC}$  en el certificado de análisis para conocer el lote de fabricación del kit. La validación de la prueba está sujeta a los siguientes criterios:

Tipo de reacción	Diana ASFV (colorante FAM™)	Diana IPC (colorante VIC™)	Interpretación
Control positivo	$C_t = C_{tQC} \text{ ASFV} \pm 3 C_t^{[1]}$	$C_t < 45$ o $C_t > 45^{[2]}$	La PCR se valida.
Control de extracción <sup>[3]</sup>	$C_t > 45$	$C_t = C_{tQC} \text{ IPC} \pm 3 C_t^{[4]}$	Se valida la extracción del ADN.
Sin control de plantilla	$C_t > 45$	$C_t > 45$	Se validan los reactivos de la PCR.

<sup>[1]</sup> Consulte la tabla EPC en el certificado de análisis.

<sup>[2]</sup> El valor de IPC del control positivo no se utiliza para la validación de la prueba.

<sup>[3]</sup> Utilice el control de extracción preparado siguiendo el mismo procedimiento de extracción utilizado con las muestras.

<sup>[4]</sup> Consulte la tabla IPC en el certificado de análisis.

### Interpretación de los resultados

Diana ASFV (colorante FAM™)	Diana IPC (colorante VIC™)	Interpretación
$C_t < 45$	$C_t < 45$ o $C_t > 45$	Se detecta ASFV.
$C_t > 45$	$C_t = C_t$ del control de extracción $\pm 3 C_t^{[1]}$	No se detecta ASFV.
$C_t > 45$	$C_t$ está fuera de este rango: $C_t$ del control de extracción $\pm 3 C_t^{[1]}$	Resultado no válido. <sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup> El valor de  $C_t$  del control de extracción debe validarse primero del modo descrito en "Criterios de validación" en la página 3.

<sup>[2]</sup> El resultado no es válido debido a un resultado de IPC no conforme.

### Repetición de los análisis de muestras con resultados no válidos

1. Diluya las muestras de ADN no válidas al 1:10 en buffer TE 1X.
2. Repita el procedimiento de PCR en tiempo real con 5  $\mu$ L de ADN diluido e interprete los resultados como se indica a continuación.

Resultado	Interpretación
El ADN diluido da positivo para ASFV.	El resultado se valida.
El ADN diluido da negativo para ASFV y el resultado del IPC es conforme.	
El ADN diluido da negativo para ASFV y el resultado del IPC no es conforme.	El resultado no es válido.

3. Para las muestras diluidas con resultados no válidos, repita el procedimiento de aislamiento de ADN con una nueva alícuota del lisado original de la muestra y, a continuación, repita la prueba.

## Buenas prácticas de laboratorio para PCR y RT-PCR

Cuando se preparan muestras para la amplificación de PCR o RT-PCR:

- Ponerse guantes limpios y una bata de laboratorio limpia.
  - No ponerse los mismos guantes ni la misma bata de laboratorio que se haya utilizado al manipular productos amplificados o preparar muestras.
- Cambiarse de guantes si se sospecha que están contaminados.
- Utilizar zonas separadas y equipo y suministros exclusivos para:
  - La preparación de la muestra y la preparación de la reacción.
  - La amplificación y el análisis de los productos.
- No llevar los productos amplificados a la zona de preparación de la reacción.
- Abrir y cerrar todos los tubos de muestras con cuidado. Evitar salpicar o rociar las muestras.
- Mantener las reacciones y los componentes tapados tanto tiempo como sea posible.
- Utilizar una pipeta de desplazamiento de aire positivo o puntas de pipeta con filtro resistentes a los aerosoles.
- Limpiar las mesas de laboratorio y el equipo periódicamente con una solución blanqueadora al 10 % o solución de descontaminación de ADN.

## Certificación de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)



Validado y certificado por la OIE como apto para las finalidades definidas en este folleto. Número de registro: 20200114.

**Fabricante:** Laboratoire Service International (LSI) | 6 Allée des Ecoreuils – Parc Tertiaire de Bois-Dieu | 69380 Lissieu – France

Traducido del texto en inglés en la publicación Número MAN0010783 Rev. C.0.

La información incluida en esta guía está sujeta a cambios sin previo aviso.

**EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD :** EN LA MEDIDA DE LO ESTIPULADO POR LA LEY, LIFE TECHNOLOGIES Y/O SUS AFILIADOS NO SE HACEN RESPONSABLES POR DAÑOS ESPECIALES, INCIDENTALES, INDIRECTOS, PUNITIVOS, MÚLTIPLES O CONSIGUIENTES EN RELACIÓN CON O DERIVADOS DE ESTE DOCUMENTO, INCLUYENDO EL USO DEL MISMO.

**Historial de revisiones:** N.º de pub. MAN0010783 (inglés)

Revisión	Fecha	Descripción
C.0	21 de julio de 2020	Se ha añadido el logotipo y el número de registro de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).
B.0	8 de febrero de 2018	<ul style="list-style-type: none"><li>• Se ha actualizado según la plantilla del documento actual, con actualizaciones asociadas a la garantía, las marcas comerciales y los logotipos.</li><li>• Se han realizado leves modificaciones para adaptarlo al estilo actual.</li></ul>
A.0	2 de abril de 2015	Línea de base del historial de revisiones.

**Información importante sobre licencias:** Estos productos pueden estar cubiertos por una o más licencias de etiquetado de uso limitado. Mediante el uso de estos productos, acepta los términos y condiciones de todas las licencias de etiquetado de uso limitado aplicables.

©2020 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales son propiedad de Thermo Fisher Scientific y sus subsidiarias a menos que se especifique lo contrario. TaqMan es una marca comercial registrada de Roche Molecular Systems, Inc., y se usa con el permiso y la licencia oportunos.

## Asistencia al cliente y soporte técnico

Visite [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support) para conocer lo último en servicios y asistencia, incluyendo lo siguiente:

- Números de teléfono de contacto de todo el mundo
  - Soporte del producto, incluyendo:
    - Preguntas más frecuentes (FAQ) sobre productos
    - Software, parches y actualizaciones
    - Formación para muchas aplicaciones e instrumentos
  - Pedidos y soporte web
  - Documentación del producto, incluyendo lo siguiente:
    - Guías de usuario, manuales y protocolos
    - Certificados de análisis
    - Hojas de datos de seguridad (HDS) (Safety Data Sheets, SDS; también conocidas como MSDS)
- Nota:** Para conocer las HDS o SDS de los reactivos y productos químicos de otros fabricantes, póngase en contacto con el fabricante.

## Garantía limitada del producto

Life Technologies Corporation y/o su(s) filial(es) garantizan sus productos tal y como se establece en los términos y condiciones generales de venta de Life Technologies, que se pueden encontrar en el sitio web de Life Technologies [www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html). Si tiene alguna duda, póngase en contacto con Life Technologies en [www.thermofisher.com/support](http://www.thermofisher.com/support).