

virotype[®] CSFV 2.0 RT-PCR Kit Manual

Para la detección del ARN del *Classical Swine Fever Virus* (CSFV)

Certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal, n.º MA: FLI-C 113



96 reacciones (n.º de catálogo VT281825)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Alemania

Contenido

Contenido del kit.....	3
Uso previsto	3
Símbolos.....	4
Control de calidad.....	4
Almacenamiento	5
Información de seguridad.....	5
Introducción	6
Principio.....	7
Extracción del ARN.....	8
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario	10
Notas importantes.....	11
Precauciones generales.....	11
Protocolo: RT-PCR en tiempo real para la detección del ARN del <i>Classical Swine Fever Virus</i>	13
Cuestiones importantes antes de comenzar	13
Antes de comenzar	13
Procedimiento.....	14
Análisis e interpretación de los datos.....	16
Interpretación de los resultados	16
Índice de cambios.....	20

Contenido del kit

virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit	(96)
N.º de catálogo	VT281825
Número de reacciones	96
Master Mix (mezcla maestra) (tubo con tapón naranja); incluye primers, sondas y enzimas	2 x 980 µl
Positive Control (control positivo) (tubo con tapón rojo)	1 x 150 µl
Negative Control (control negativo) (tubo con tapón azul)	1 x 150 µl
Manual	1

Uso previsto

El virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit está destinado a la detección de ARN del *Classical Swine Fever Virus* (CSFV) en suero, plasma, sangre, tejido, hisopos y muestras conservadas en medios de transporte estabilizante procedentes de cerdos y jabalíes.

Este kit está autorizado por el Friedrich-Loeffler-Institut y ha sido certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal (FLI-C 113) para su uso en Alemania en procedimientos de diagnóstico veterinario.

Para uso exclusivo en el ámbito veterinario.

Símbolos



Fabricante legal



Número de lote



Fecha de caducidad



Límites de temperatura para almacenamiento



Manual



Número de catálogo



Número de material



Proteger de la luz



Para muestras de cerdos y jabalíes

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de INDICAL, cada lote del virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Almacenamiento

Los componentes del virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit deben almacenarse a una temperatura comprendida entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Evite repetir el ciclo de descongelación-congelación (>3 veces), ya que esta práctica reduce la sensibilidad del ensayo. Congele los componentes en alícuotas si solo van a utilizarse de forma intermitente.

Información de seguridad

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede solicitarlas a su representante de ventas local o por correo electrónico a compliance@indical.com.

Todos los residuos de muestras y los objetos que han estado en contacto con las mismas deben descontaminarse o eliminarse como material potencialmente infeccioso.

Introducción

El virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit es una solución altamente sensible y específica para la detección de ARN del *Classical Swine Fever Virus* (CSFV) en muestras de cerdos y jabalíes. Desde el punto de vista económico, la Classical Swine Fever (CSF) es una de las infecciones víricas más importantes de los cerdos. La CSF se propaga en las poblaciones de cerdos domésticos y jabalíes. La CSF es una enfermedad animal de declaración obligatoria internacional. El microorganismo causante, *Classical Swine Fever Virus*, es un virus de ARN monocatenario que pertenece al género *Pestivirus* que es miembro de la familia *Flaviviridae* como el *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV) en el ganado bovino y el *Border Disease Virus* (BDV), en el ovino.

La alta sensibilidad del virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit permite la detección temprana del patógeno en muestras individuales o agrupadas de suero, plasma, sangre, en muestras individuales o agrupadas de tejido, así como también en hisopos muestras conservadas en medios de transporte estabilizante procedentes de cerdos y jabalíes. El virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit detecta cepas pertenecientes a los genotipos 1.1, 1.2, 1.3, 1.4*, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2*, 3.3* y 3.4 (* genotipos confirmados únicamente mediante análisis *in silico*). En casos poco frecuentes, la prueba puede detectar el virus en la vacuna contra la CSF. Por tanto, los resultados positivos de animales de zonas en las que se administran vacunas contra el CSFV deben ser verificados.

Principio

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma de un patógeno. En la PCR en tiempo real, el producto amplificado se identifica mediante marcadores de fluorescencia. Estos suelen estar ligados a sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente al producto amplificado. La supervisión de las intensidades de la fluorescencia durante la serie de PCR (es decir, en tiempo real) permite detectar el producto acumulado sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción posteriormente.

El virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit contiene todos los reactivos necesarios para la detección de ARN del CSFV, incluidos un Positive Control y un Negative Control. Con este kit, tanto la transcripción inversa como la PCR tienen lugar en un solo tubo de reacción, lo que reduce el riesgo de contaminación.

Un control interno excluye la posibilidad de resultados negativos falsos. El kit utiliza dos combinaciones específicas de primer/sonda:

- Fluorescencia FAM™ para ARN del CSFV
- Fluorescencia JOE™ para el control interno endógeno (EC; β -actina presente en la muestra)

Un Positive Control permite verificar la funcionalidad de la mezcla de reacción para la amplificación del ARN diana del CSFV.

Extracción del ARN

El virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit se puede utilizar para la detección de ARN del CSFV de sangre, tejido, hisopos y muestras conservadas en medios de transporte estabilizante procedentes de cerdos y jabalíes.

Debido a la alta sensibilidad de la prueba, se pueden analizar muestras individuales o agrupadas. Para los cerdos domésticos, se pueden utilizar hasta 20 muestras individuales de suero, plasma, sangre con EDTA o hasta 10 muestras de tejido. Además, para los jabalíes, los grupos pueden constar de hasta 10 muestras de suero, plasma, sangre con EDTA o tejido. Además, se pueden analizar hisopos y muestras conservadas en medios de transporte estabilizante procedentes de cerdos y jabalíes.

Nota: El análisis de mezclas de muestras conlleva una disminución de la sensibilidad analítica del ensayo y por tanto la posibilidad de que no se detecten muestras débilmente positivas.

Nota: En caso de uso en Alemania, se aplican las especificaciones descritas en el "*Amtliche Methodensammlung*".

Antes de realizar la RT-PCR en tiempo real, debe extraerse ARN vírico del material de partida. INDICAL ofrece una amplia gama de kits validados diseñados para la extracción de ARN de muestras de animales.

Extracción basada en microesferas magnéticas:

- **IndiMag® Pathogen Kit*** (SP947457)
- **IndiMag Pathogen Kit* w/o plastics** (SP947257)

- **IndiMag Pathogen IM48 Cartridge** (SP947654P608, SP947654P224)
- **IndiMag Pathogen KF96 Cartridge** (SP947855P196)

Extracción basada en columnas de centrifugado:

- **IndiSpin® Pathogen Kit*** (SP54104, SP54106)
- **IndiSpin QIAcube® HT Pathogen Kit** (SP54161)

* adecuado para la extracción simultánea de ARN del CSFV y de ADN del ASFV

Si la RT-PCR en tiempo real no se realiza inmediatamente después de la extracción, almacene el ARN a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o bien a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

Para obtener más información sobre la extracción automatizada y manual del ARN del CSFV de diferentes tipos de muestras, consulte el manual correspondiente o póngase en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL a través de support@indical.com.

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Pipetas
- Puntas de pipeta exentas de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros
- Tubos Eppendorf® de 1,5 ml estériles
- Consumibles exentos de nucleasas (sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa). Debe prestarse especial atención para evitar la contaminación con nucleasas de todos los reactivos y consumibles utilizados para configurar la PCR a fin de realizar una identificación sensible de los ácidos nucleicos víricos
- Dispositivo para enfriamiento o hielo
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de 1,5 ml
- Termociclador en tiempo real con canales de fluorescencia adecuados
- Software adecuado para el termociclador en tiempo real elegido
- Tubos y tapones de tiras adecuados o microplaca óptica de 96 pocillos con película de sellado óptica o tapa para el termociclador en tiempo real elegido

Notas importantes

Precauciones generales

El usuario debe proceder siempre respetando las siguientes recomendaciones:

- Utilice puntas de pipeta exentas de nucleasas con filtros.
- Almacene y extraiga los materiales positivos (muestras, controles positivos y amplicones) en procedimientos independientes con respecto al resto de reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en una sala separada físicamente.
- Descongele todos los componentes en hielo antes de iniciar un ensayo.
- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes mediante inversión y centrifúgelos brevemente.
- No utilice los componentes del kit de prueba si están caducados.
- Conserve las muestras y los controles en hielo o en un bloque de enfriamiento durante la configuración de las reacciones.

Control negativo

Como mínimo debe incluirse una reacción de negative control en cada serie de PCR, que contenga todos los componentes de la reacción, excepto la secuencia del patógeno. Esta acción permite evaluar la contaminación de la reacción.

Control positivo

Si el procedimiento de la PCR se realiza en muestras no conocidas, se recomienda efectuar una reacción de positive control en la serie de PCR que contenga una muestra con ARN vírico diana. Un positive control permite demostrar la funcionalidad del ensayo del patógeno, p. ej., que la mezcla de reacción se ha configurado correctamente. Utilice 5 µl del Positive Control suministrado con el virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit para probar que la diana se ha amplificado correctamente.

Control de la extracción y la amplificación

Para una mayor seguridad y comodidad del proceso, se incluye un ensayo de control de extracción y amplificación en el kit de prueba.

Un control interno endógeno (Endogenous Internal Control, EC) detecta el gen de la β -actina presente en la muestra. De este modo se pueden supervisar los pasos de extracción y amplificación.

Protocolo: RT-PCR en tiempo real para la detección del ARN del *Classical Swine Fever Virus*

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea el apartado “Notas importantes”, en la página 11, antes de comenzar.
- Incluya como mínimo un control positivo (Positive Control) y un control negativo (Negative Control) para cada serie de PCR.
- Antes de comenzar el procedimiento, lea detenidamente el protocolo y familiarícese con el funcionamiento del termociclador para PCR en tiempo real elegido.
- El ARN es inestable. Lleve a cabo el protocolo sin interrupción.

Antes de comenzar

- Descongele todos los reactivos en hielo y protéjalos de la luz.
- Antes de utilizarlos, centrifugue brevemente los reactivos.
- Conserve los reactivos en hielo o en un bloque de enfriamiento durante la configuración de la PCR.

Procedimiento

1. Antes de utilizarla, mezcle la Master Mix invirtiéndola 5 veces o hasta que se mezcle bien y, a continuación, centrifugue brevemente para recoger los líquidos.
2. Pipetee 20 µl de la Master Mix en cada tubo de reacción. Después, añada 5 µl de ARN de muestra (tabla 1).

Incluya reacciones de positivo control y negativo control.

Positive Control: utilice 5 µl del control positivo (Positive Control) en lugar de ARN de muestra.

Negative Control: utilice 5 µl del control negativo (Negative Control) en vez de ARN de muestra.

Tabla 1. Preparación de la mezcla de reacción

Componente	Volumen
Master Mix	20 µl
Muestra	5 µl
Volumen total	25 µl

3. Cierre los tubos de reacción o selle la placa e invierta 5 veces o hasta que se mezclen bien. A continuación, centrifugue brevemente para recoger los líquidos.
4. Defina los filtros para los marcadores indicadores en el software del termociclador de acuerdo con la tabla 2.

Tabla 2. Configuración de los filtros para el indicador

Patógeno/control interno	Indicador
CSFV	FAM
Control interno endógeno (Endogenous Internal Control, EC)	HEX/JOE™ ¹
Referencia pasiva ²	ROX™

¹ Utilice la opción adecuada para su termociclador.

² Referencia interna para su uso con los ABI PRISM® Sequence Detection Systems (Applied Biosystems®)

5. Ejecute el protocolo de PCR en tiempo real de acuerdo con la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de RT-PCR en tiempo real para CSFV 2.0

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Transcripción inversa	50 °C	10 min	1
Activación inicial	95 °C	2 min	1
Ciclado en 2 pasos			
Desnaturalización	95 °C	5 s	40
Hibridación/extensión*	60 °C	30 s	

* Recopilación de datos de fluorescencia, tiempo de análisis aproximado 72 min (CFX96, Bio-Rad™)

Nota: El protocolo indicado anteriormente también se puede utilizar junto con el virotype ASFV 2.0 PCR Kit.

Análisis e interpretación de los datos

Interpretación de los resultados

Para que el ensayo tenga validez, el Positive Control debe emitir una señal en los canales FAM y HEX/JOE con un $C_T^1 < 35$. El Negative Control no debe emitir señal.

Los resultados siguientes son posibles cuando se trabaja con muestras desconocidas. Los resultados posibles de las muestras también se resumen en la tabla 4 de la página 18.

Para que la muestra se considere positiva para el CSFV y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra emite una señal en el canal FAM (independientemente de cualquier señal en el canal HEX/JOE).
- El Positive Control emite una señal en los canales FAM y HEX/JOE.
- El Negative Control no emite una señal en los canales FAM y HEX/JOE.

Tenga en cuenta que unas concentraciones muy altas de ARN de CSFV en la muestra pueden reducir la señal del control interno endógeno (Endogenous Internal Control [EC]; canal HEX/JOE) o incluso suprimirla debido a la competencia con el control interno.

¹ Ciclo umbral (C_T): ciclo en que el gráfico de amplificación cruza el umbral; es decir, cuando aparece el primer aumento claramente detectable de la fluorescencia.

Para que la muestra se considere negativa para el CSFV y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra **no emite** ninguna señal en el canal FAM.
- La muestra emite una señal en el canal HEX/JOE.
- El Positive Control emite una señal en los canales FAM y HEX/JOE.
- El Negative Control no emite una señal en los canales FAM y HEX/JOE.

Para que los resultados de la muestra se consideren no concluyentes y el ensayo no sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra no emite ninguna señal en los canales FAM y HEX/JOE.

Si no se detecta una señal en los canales FAM (CSFV) y HEX/JOE (control interno endógeno [Endogenous Internal Control, EC]), el resultado es no concluyente. La ausencia de señal para el gen constitutivo indica una inhibición marcada de la PCR u otro error, p. ej., durante la extracción.

Para realizar una comprobación de inhibición, recomendamos efectuar una dilución 1:5 del ARN de muestra en agua sin nucleasas, repetir el procedimiento de extracción del ARN, o repetir todo el procedimiento de prueba comenzando con nuevo material de muestra.

Compruebe que haya una señal de fluorescencia en el canal FAM para la reacción del control positivo (Positive Control). La ausencia de señal para el Positive Control indica que se ha producido un error, que podría deberse a una configuración incorrecta de la mezcla de reacción o a condiciones de ciclado inadecuadas.

Tabla 4. Tabla de interpretación de resultados*

Resultado de la muestra	FAM (CSFV)	HEX/JOE (EC)
Positivo para CSFV	X	X
Marcado positivo para CSFV	X	
Negativo para CSFV		X
No concluyente		

* La interpretación de los resultados de las muestras puede determinarse siempre que se realicen reacciones de control positivo y negativo. El Positive Control debe emitir una señal en los canales FAM y HEX/JOE. El Negative Control no debe emitir ninguna señal en ningún canal. Para obtener una explicación detallada de los resultados posibles de las muestras, consulte el apartado “Análisis e interpretación de los datos” en la página 16.

INDICAL ofrece una amplia gama de kits para ELISA así como kits para PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real para la detección de patógenos de animales.

Visite www.indical.com para obtener más información sobre productos afosa, bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype, Svanovir y virotype.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o el manual del usuario del kit de INDICAL correspondiente.

Notas

Acuerdo de licencia limitada para el virotype CSFV 2.0 RT-PCR Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. INDICAL no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual y los protocolos adicionales disponibles en www.indical.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de INDICAL para usuarios de INDICAL. INDICAL no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, INDICAL no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, INDICAL no garantiza que este kit y/o su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. INDICAL niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. INDICAL se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidos los costes procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para conocer los términos de licencia actualizados, consulte www.indical.com.

Marcas comerciales: afosa®, bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, pigtype®, Svanovir®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); ABI PRISM® (Applied Biosystems); Bio-Rad™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.); FAM™, HEX™, JOE™, ROX™ (Life Technologies Corporation); Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Sondas con licencia fabricadas por Integrated DNA Technologies, Inc. Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

HB-2576-ES-001 © 2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

Índice de cambios

Manual	Versión	Cambio
HB-2576-EN-001	Julio de 2022	Lanzamiento de producto

INDICAL
BIOSCIENCE

Pedidos: www.indical.com/contact
Servicio técnico: support@indical.com
Sitio web: www.indical.com