



FIND-IT Bronquitis Infecciosa Aviar



Sistema para la detección del virus de Bronquitis Infeccioso Aviar por Transcripción Reversa y PCR en Tiempo Real en un solo paso.

FBIA 50 – Bronquitis Infecciosa Aviar: Sistema para **50** reacciones.

FBIA 100 – Bronquitis Infecciosa Aviar: Sistema para **100** reacciones.

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

FIND-IT Bronquitis Infecciosa Aviar consiste en un sistema basado en Transcripción Reversa (RT) y Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR), para detectar y cuantificar la presencia del genoma del virus de bronquitis Infecciosa Aviar, empleando como blanco de amplificación una región altamente conservada del extremo 5'. El sistema emplea ARN obtenido de muestras clínicas, tejidos, líquidos alantoideos y cultivos celulares. **FIND-IT Bronquitis Infecciosa Aviar** integra RT y PCR-TR en **un solo paso**, únicamente requiere agregar el ARN purificado de su muestra. Este sistema, tiene la capacidad de diagnosticar el virus influenza tipo A, a partir de muestras clínicas en medicina veterinaria.

El sistema incluye iniciadores y sondas TaqMan, así como los reactivos que permiten realizar la transcripción reversa y la PCR-TR para amplificar, detectar y cuantificar el virus de la bronquitis infecciosa aviar, en un solo paso. Este sistema resulta extremadamente seguro, gracias a la incorporación de un control interno, el cual en cada reacción siempre amplifica, lo que permite monitorear la presencia de sustancias inhibitorias y descartar falsos negativos.

El sistema también incluye un **ADN control positivo**, que permite construir una curva de referencia para cuantificar el número de copias virales presentes en la muestra.

El kit es sumamente fácil de usar, contiene los ingredientes necesarios para 50 - 100 reacciones que permiten amplificar, detectar y cuantificar el virus de la bronquitis infecciosa aviar.

ANTECEDENTES

La bronquitis infecciosa es una enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio superior en los pollos^{1,2}. También puede afectar a los riñones y el aparato reproductivo. Es de gran importancia económica en la industria avícola debido a su alta morbilidad y pérdidas de la producción asociadas con la enfermedad. El agente etiológico es el virus de bronquitis infecciosa (IBV)².

Es importante la rápida diferenciación entre el IBV de agentes de otras enfermedades del tracto respiratorio superior, como el virus de influenza aviar y de la enfermedad de Newcastle, los cuales son muy similares en la etapa inicial de la enfermedad².

El virus de bronquitis infecciosa se clasifica dentro de la familia *Coronaviridae* y dentro del género *Coronavirus*. El virus de bronquitis infecciosa es un virus envuelto, tiene un diámetro de 120 a 160 nanómetros, su simetría es helicoidal. Su genoma que es ARN de cadena simple sentido positivo no segmentado tiene un tamaño de aproximadamente 27 kb. Existen diferentes serotipos del virus, los cuales no presentan inmunidad cruzada².

PRINCIPIO DEL ENSAYO

La RT-PCR-TR es una herramienta de diagnóstico molecular muy poderosa, sensible y específica. Este sistema, se basa en la amplificación selectiva de un segmento por PCR y su detección específica mediante una sonda TaqMan, que al hibridar con el producto de amplificación, es degradado generando fluorescencia en el momento que ocurre la amplificación (en tiempo real). Esta fluorescencia es detectada por un equipo termociclador de tiempo real, que posee un sistema óptico de excitación y de detección de fluorescencia.

Debido a que el genoma del virus de Bronquitis Infeccioso Aviar es de ARN, es necesario para su identificación obtener primero el ARN de la muestra, generar una copia de ADN (cDNA) y posteriormente amplificarla y detectarla por PCR-Tiempo Real. En la detección selectiva de un segmento diagnóstico del virus, se emplea una sonda TaqMan, que es un oligonucleótido sintético que posee la secuencia de nucleótidos complementaria al producto de amplificación. Esta sonda TaqMan posee dos fluoróforos que al estar en los extremos del oligonucleótido, no generan fluorescencia ya que se inhiben mutuamente. Cuando la sonda TaqMan hibrida específicamente al producto de amplificación, esta es degradada por la acción 5' exonucleasa de la ADN Taq polimerasa. Cuando esto sucede, se separa el fluoróforo reportero de otro que inhibe su fluorescencia. Solamente cuando la sonda hibrida con el segmento de ADN específico y es

degradada, es posible detectar la amplificación del segmento de ADN diagnóstico. Esto hace la detección sumamente específica y sensible.

CONTENIDO DEL KIT

1.- Find-It Influenza SuperMix RT-PCR-TR 2X*. (2 viales con 250µl) (oligonucleótidos y sondas TaqMan, ADNTaqPolimerasa, amortiguador, dNTP`s, MgCl₂, Transcriptasa Reversa [Moloney Murine Leukemia Virus], Inhibidor de RNAsas, ADN del control interno y H₂O).

2.- ADN estándar de cuantificación* (1ng/µl = 2.97 X10⁸ moléculas/µl) (25µl)

3.- H₂O DEPC (500µl)

La sonda TaqMan para la detección del virus de bronquitis infeccioso aviar está marcada con Cy5/BHQ2 (rojo). La sonda del control interno está marcada con HEX/BHQ1 (Amarillo).

El control interno está incluido en la Super Mix RT-PCR-TR. Este control interno es un segmento de ADN que siempre amplifica en la reacción y permite al usuario monitorear la posible presencia de inhibidores de la reacción y descartar falsos negativos.

*Almacenamiento a -20°C

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1.- Añada hasta 10 µl de la muestra de RNA o del control positivo en un tubo. Cuando sea necesario complemente a un volumen de 10 µl con H₂O DEPC.

2.- Añada 10 µl de la Super Mix RT-PCR-TR 2X

3.- Someta el tubo a amplificación-detección en un equipo termociclador de Tiempo Real. Programación del equipo: **42°C por 30min, 95°C por 10min, 40 ciclos de 95°C por 15seg y 60°C por 45seg.**

Asegúrese que el equipo detecta en los canales 535 - 556 nm (amarillo) y 656 – 670 nm (rojo).

CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CUANTIFICACIÓN

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del virus de Influenza A, se recomienda amplificar 4 diferentes cantidades conocidas del ADN control estándar. Para esto, se deben realizar 4 diluciones decuples seriadas a partir de la concentración inicial del ADN control estándar, para lo cual se colocan en 4 tubos 45µl de H₂O y se toman 5µl del ADN control estándar agregándolo al primer tubo, se homogeniza la mezcla utilizando un agitador tipo vortex y se toman 5µl

para agregarlo al 2º tubo y así sucesivamente como se muestra en la figura 1. Para realizar la curva estándar de amplificación, se toman 10µl de cada dilución, se le agregan 10µl de la Super Mix RT-PCR-TR y se somete a las condiciones recomendadas de amplificación.

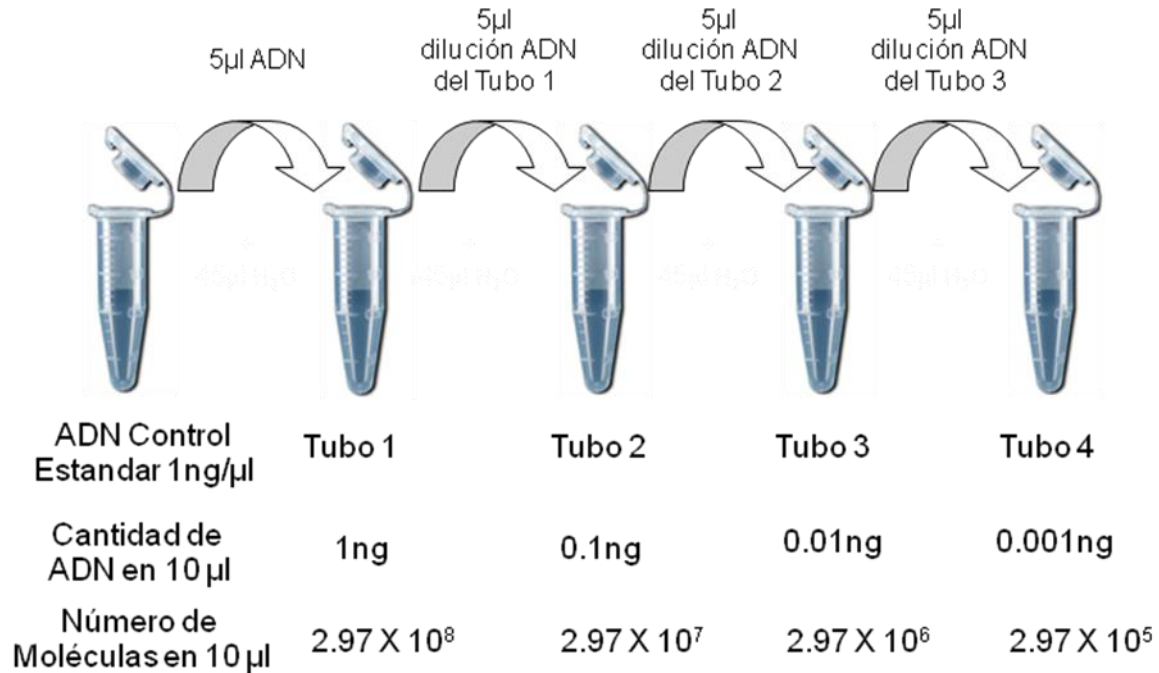


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

ANÁLISIS DE DATOS

Una muestra es considerada positiva siempre que la fluorescencia emitida sea mayor a la de los controles negativos.

Una muestra es considerada negativa siempre que la fluorescencia emitida sea menor o igual a la de los controles negativos.

Una muestra puede ser cuantificable siempre que la fluorescencia emitida se encuentre en el rango de fluorescencia de la curva estándar.

MATERIAL REQUERIDO NO PROPORCIONADO

Kit para la extracción de ARN; Micropipetas y puntas; Vortex; Microtubos para las reacciones de RT-PCR-TR; Equipo de PCR en Tiempo Real.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cavanagh D, Naqi SA, Saif YM (Ed.), Infectious Bronchitis, Diseases of Poultry. Iowa State University Press, Ames, IA, 2003.pp. 101–119.
- 2.- Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet. Res. 2007;38:281-297.

ANEXO

Toma, envío y procesamiento de la muestra

Colección de la muestra

- 1.-Inserte un hisopo seco en alguno de los orificios nasales y dentro del área nasofaríngea.
- 2.-Presione suavemente el hisopo contra la pared de la mucosa nasal, permitiendo que el hisopo absorba las secreciones.
- 3.-Rotar el hisopo dos o tres veces y retirarlo.
- 4.-Colocar el hisopo en un tubo estéril con 2 ó 3ml de medio de transporte viral.
- 5.-Rompa el palo del hisopo y cierre el tubo.

Transporte de la muestra

Emplee refrigerantes para mantener la muestra a una temperatura entre 2 a 10°C.

Almacenamiento de las muestras

Almacenar a 2 a 10°C hasta por 72hrs antes de procesarlo. Almacenar a -72°C por periodos más prolongados.

Extracción de ARN

Siga las recomendaciones del kit o técnica de extracción de ARN que utilice.

Suspender el ARN en un volumen de 50ul con H₂O DEPC.