



FIND-IT INFLUENZA-H5



Sistema para la detección del virus de influenza aviar serogrupo H5 y excluir el serotipo H7, por transcripción reversa y PCR en tiempo real en un solo paso.

FIH5 50 – Find IT Influenza-H5: Sistema para 50 reacciones.

FIH5 100 – Find IT Influenza-H5: Sistema para 100 reacciones.

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

FIND-IT INFLUENZA-H5 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 Influenza aviar H5. **El sistema emplea dos blancos de amplificación en el virus de influenza: el gen M (que codifica para la proteína de la matriz) y el gen HA5 (que codifica para la hemaglutinina serogrupo 5).**

El sistema emplea ARN obtenido de tejidos, líquidos alantoideos y cultivos celulares. **FIND-IT INFLUENZA-H5** 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 influenza aviar serotipo H5, a partir de muestras clínicas en medicina veterinaria.

El sistema puede ser empleado para **detectar por exclusión la presencia del virus de influenza aviar serogrupo H7**. Si en la muestra se encuentra el virus de serogrupo H7 (u otro serogrupo), el ensayo detectará positivo para el gen M, pero negativo a H5. Si el virus es serogrupo H5, tanto el gen M como el H5 resultarán positivos.

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 influenza tipo A, en un solo paso. Este sistema resulta extremadamente seguro, gracias a la incorporación de un control interno que permite monitorear la presencia de sustancias inhibitorias y descartar resultados 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.

FIND-IT INFLUENZA-H5 tiene una sensibilidad para detectar de 100 a 1000 partículas virales por reacción.

El kit es sumamente fácil de usar, contiene los ingredientes necesarios para 50 reacciones que permiten amplificar, detectar y cuantificar el virus de influenza tipo A.

ANTECEDENTES

El virus de influenza tipo A pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y al género *Influenzavirus A*^{1,2}. El virión está envuelto, esférico y pleomórfico, a veces tiene forma filamentosa, su diámetro es de 80-120 nanómetros, su longitud de 200-300 nanómetros y su simetría es helicoidal^{1,2}. El genoma se divide en ocho segmentos de RNA sentido negativo, que codifican para diversas proteínas. El genoma completo es 13,600 bases^{1,2}.

Los virus de influenza A se clasifican en base a las propiedades antigénicas de la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), glicoproteínas expresadas en la superficie de las partículas virales^{1,3}. Actualmente, el virus de influenza A esta representado por 16 HA y 9 NA subtipos, que han sido detectados en animales silvestres y en aves domésticas alrededor del mundo^{1,3}.

El virus de influenza tipo A ha sido aislado de muchas especies animales, incluyendo al humano, cerdos, perros, caballos, visones, mamíferos marinos y un amplio rango de animales domésticos y silvestres (predominantemente aves silvestres: patos, gansos y aves acuáticas)^{1,3}. El virus de Influenza A infecta preferencialmente a las células del epitelio del tracto respiratorio e intestinal de las aves y es excretado en altas concentraciones en secreciones respiratorias^{1,3}.

Influenza aviar

El virus de influenza aviar se encuentra generalmente en las aves silvestres pero en ellas no tiene una actividad patogénica, sin embargo, tiene una alta morbilidad y mortalidad cuando se transmite a otras especies incluyendo aves domésticas y mamíferos^{1,3}.

Los virus de influenza aviar, se clasifican en dos patotipos, basados en su virulencia en aves domésticas: Influenza de baja patogenicidad (LPAI) e influenza de alta patogenicidad (HPAI)¹ (por sus siglas en inglés).

En México se encuentran circulando de forma endémica el virus de influenza aviar de serogrupos **H5N2** y **H7N3**.

Los primeros casos del virus de influenza aviar en México fueron detectados a finales de 1993, siendo identificados en mayo de 1994 como **H5N2** de **LPAI**. En ese año, el virus se expandió ampliamente mutando a un virus **HPAI**, en dos regiones de México, Puebla y Querétaro⁴. En 1995 el gobierno Mexicano empezó a usar la vacunación como ayuda en el control de ambos virus, HPAI y LPAI⁵. Aunque el virus de **HPAI no se ha reportado** desde entonces, los virus LPAI han seguido circulando en México de forma endémica.

En junio-julio de 2012, apareció en granjas avícolas de Jalisco un brote de influenza aviar de una nueva variedad, **H7N3**, el cual fue caracterizado como HPAI (<http://www.fao.org/docrep/016/an395e/an395e.pdf>), extendiéndose rápidamente a otras regiones del país.

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 detección de fluorescencia.

Debido a que el genoma del virus de Influenza Aviar es de ARN, es necesario para su identificación obtener primero el ARN de la muestra, generar una copia de ADN (cDNA), posteriormente amplificarla y detectarla por PCR-Tiempo Real. En la detección selectiva de un segmento diagnóstico del virus de Influenza, 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.

El sistema emplea ARN obtenido de muestras de: exudados traqueales obtenidos con hisopos y preservados en un medio de transporte, Muestras de tejidos:

Fragmentos de tráquea, pulmón. Muestras de sangre completa, plasma o suero. Cultivos virales a partir de líquidos alantoideos y/o cultivos celulares.

CONTENIDO DEL KIT

1.- Find-It Influenza-H5 SuperMix RT-PCR-TR 2X*. (2 o 4 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 = 2.52 X10⁸ moléculas/µl) (25µl)

3.- H₂O DEPC (500µl)

El sistema tiene 3 juegos de iniciadores y sondas TaqMan. Uno para la detección de **gen M**, que detecta cualquier virus de Influenza tipo A marcado con **FAM/TAMRA (Verde)**. Otro juego marcado con **HEX/BHQ1 (amarillo)** que detecta **la hemaglutinina del serogupo H5**. Además, un juego que detecta el **control interno** marcado con **CalFluorRed-BHQ2 (naranja)**.

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 complementa 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 495 -520 nm (verde); 535 - 556 nm (amarillo) y 585 - 610 nm (naranja).

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. Una vez finalizada la serie de diluciones, se desechan 5µl de la última dilución 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.

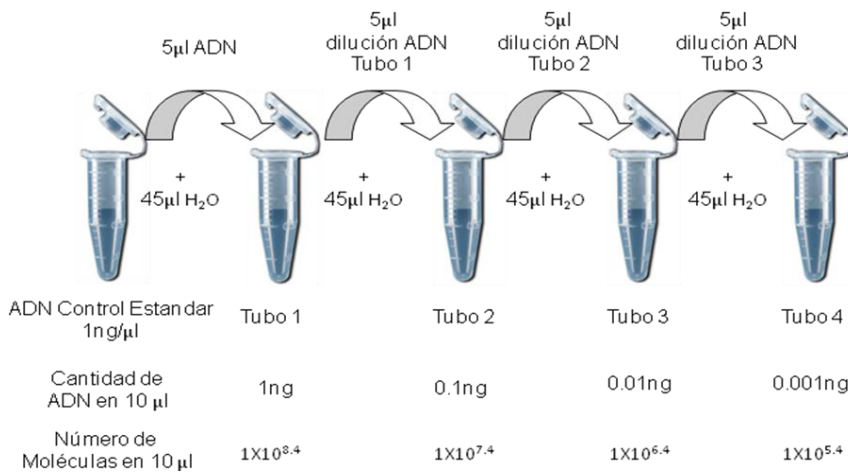


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

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.

Si el virus es serogrupo H5, tanto el gen M como el H5 resultarán positivos.

El sistema puede detectar la presencia del **virus de influenza aviar serogrupo H7**. Si en la muestra se encuentra el virus de serogrupo H7, el ensayo **detectará positivo para el gen M, pero negativo a H5**.

MATERIAL REQUERIDO NO PROPORCIONADO

Kit para la extracción de ARN

Micropipetas y puntas para micropipetas

Vortex

Microtubos para las reacciones de RT-PCR-TR

Termociclador en Tiempo Real.

CONSIDERACIONES OFICIALES

Los resultados obtenidos de ensayos de Influenza (positivos y negativos, aves, cerdos, y equinos) deberán ser reportados a CIVE de acuerdo a los artículos 160 y 161 de la ley federal de sanidad animal; el acuerdo del 20 de septiembre de 2007, en donde se enlistan las enfermedades de notificación obligatoria y el punto 7.1.1.1 de la norma oficial mexicana NOM 046-zoo-1995

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Flint SJ, Emquist LW, Racaniello VR and Skalka AM. Principles of Virology. Second Edition. ASM PRESS. 2004.
- 2.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>
- 3.- Fouchier RA, *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J. Virol 2005; 79: 2814–2822.
- 4.- Villareal-Chavez, C. L., and A. O. Flores. 1998. The Mexican avian influenza (H5N2) outbreak, p. 18–22. *In* D. E. Swayne and R. D. Slemons (ed.), Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza. United States Animal Health Association, Richmond, Va.
- 5.- Villarreal-Chavez, C., and E. Rivera-Cruz. 2003. An update on avian influenza in Mexico. Avian Dis. 47:1002–1005.

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 (PBS o medio de transporte vira).
- 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.

Se recomienda usar RNAget (Biotecnologías Moleculares No cat. RP-200).

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