



FIND-IT INFLUENZA



KIT PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA TIPO A POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR EN TIEMPO REAL EN UN SOLO PASO

FI 50 – Find IT Influenza: Sistema para **50** reacciones.

FI 100 – Find IT Influenza: Sistema para **100** reacciones.

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

FIND-IT INFLUENZA 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 tipo A, empleando como blanco de amplificación el gen M de este virus (que codifica para la proteína de la matriz). El sistema emplea ARN obtenido de tejidos, líquidos alantoideos y cultivos celulares. **FIND-IT INFLUENZA** 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 tipo A, a partir de muestras clínicas.

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 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 tiene una sensibilidad para detectar de 100 a 1000 copias 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, es 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 está 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}.

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 Influenza 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 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 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 = 2.52 X10⁸ moléculas/µl) (25µl)
- 3.- H₂O DEPC (500µl)

La sonda TaqMan para la detección del virus de Influenza tipo A está marcada con FAM/TAMRA (Verde). 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 para verde y amarillo.**

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.

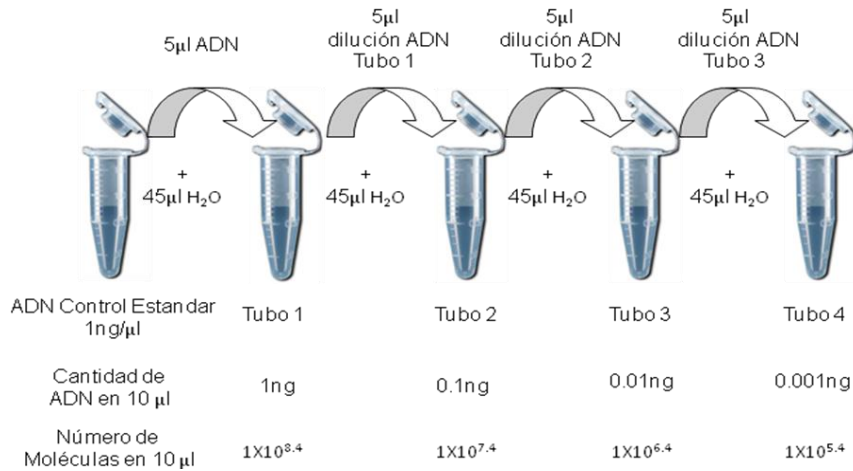


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

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.

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.

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.

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 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.

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

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