

# virotype<sup>®</sup> Influenza A 2.0 RT-PCR Kit Manual

Para la detección de ARN del  
Influenza A virus

Certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal, n.º MA: FLI-C 116



100 reacciones (n.º de catálogo VT282625)



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

# Contenido

Contenido.....	2
Contenido del kit.....	3
Uso previsto.....	3
Símbolos.....	5
Control de calidad.....	5
Almacenamiento.....	6
Información de seguridad.....	6
Introducción.....	7
Principio.....	8
Extracción del ARN.....	9
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario.....	11
Notas importantes.....	12
Precauciones generales.....	12
Protocolo: RT-PCR en tiempo real para detectar el ARN del Influenza A Virus.....	14
Cuestiones importantes antes de comenzar.....	14
Antes de comenzar.....	14
Procedimiento.....	15
Análisis e interpretación de los datos.....	17
Interpretación de los resultados.....	17
Índice de cambios.....	24

## Contenido del kit

virotype Influenza A 2.0 RT-PCR Kit	(100)
N.º de catálogo	VT282625
Número de reacciones	100
Master Mix (mezcla maestra) (tubo con tapón naranja); incluye enzimas, primers y sondas	2 x 1000 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 Influenza A 2.0 RT-PCR Kit se ha diseñado para la detección de ARN del Influenza A Virus en hisopos bucofaríngeos, traqueales y cloacales (individuales o agrupados), muestras fecales o de tejido procedentes de aves; hisopos nasales, líquido del lavado broncoalveolar (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) y muestras de tejido procedentes de ganado porcino, así como también hisopos nasales de équidos.

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 116) 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 procedentes de aves, cerdos y équidos

## Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de INDICAL, cada lote del virotype Influenza A 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 Influenza A 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](mailto: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 Influenza A 2.0 RT-PCR Kit es una solución de alta sensibilidad que sirve para detectar de forma segura y sensible ARN del Influenza A Virus en muestras procedentes de aves, cerdos y équidos.

El Influenza A Virus es un virus de ARN monocatenario encapsulado que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, género *Alphainfluenzavirus*. Los virus de Influenza A presentan una gran diversidad genética y una amplia gama de virulencia. Se agrupan en cepas de baja y alta patogenicidad. Las anseriformes son el reservorio natural de los virus de la gripe aviar de baja patogenicidad (Low Pathogenic Avian Influenza Viruses, LPAIV). Los virus de la gripe aviar de alta patogenicidad (Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses, HPAIV) pertenecen a los subtipos H5 o H7 y pueden causar peste aviar en las aves de corral domésticas, lo que conlleva pérdidas económicas importantes.

Los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 del Influenza A Virus también pueden provocar infecciones en las vías respiratorias del ganado porcino de la misma forma que el subtipo H3N8 puede provocarlas en équidos.

# 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 Influenza A 2.0 RT-PCR Kit contiene todos los reactivos necesarios para la detección de ARN de Influenza A Virus, incluidos un Positive 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.

El virotype Influenza A 2.0 RT-PCR Kit utiliza dos combinaciones específicas de primer/sonda:

- Fluorescencia FAM™ para ARN del Influenza A Virus
- Fluorescencia HEX™ para el control interno endógeno (Endogenous Internal Control, EC;  $\beta$ -actina presente en la muestra)

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

# Extracción del ARN

El virotype Influenza A 2.0 RT-PCR Kit se puede utilizar para detectar ARN del Influenza A Virus a partir de los siguientes tipos de muestras:

- Aves: hisopos bucofaríngeos, traqueales y cloacales (individuales o agrupados), muestras fecales, muestras de tejido
- Ganado porcino: hisopos nasales, líquido del lavado broncoalveolar (BALF), muestras de tejido
- Équidos: hisopos nasales

Debido a la elevada sensibilidad de la prueba, se pueden analizar agrupaciones de hasta 10 muestras individuales de hisopos.

**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)

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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para un almacenamiento más prolongado.

Para obtener más información sobre la extracción automatizada y manual de ARN del Influenza A Virus 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](mailto: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 el 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 Influenza A 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  $\beta$ -actina presente en la muestra. De este modo se pueden supervisar los pasos de extracción y amplificación.

# Protocolo: RT-PCR en tiempo real para detectar el ARN del Influenza A Virus

## Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea el apartado “Notas importantes”, en la página 12, 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  $\mu\text{l}$  de la Master Mix en cada tubo de reacción. Después, añada 5  $\mu\text{l}$  de ARN de muestra (tabla 1).

Incluya reacciones de positivo control y negativo control.

Positive Control: utilice 5  $\mu\text{l}$  del control positivo (Positive Control) en lugar de ARN de muestra.

Negative Control: utilice 5  $\mu\text{l}$  del control negativo (Negative Control) en vez de ARN de muestra.

Tabla 1. Preparación de la mezcla de reacción

Componente	Volumen
Master Mix	20 $\mu\text{l}$
Muestra	5 $\mu\text{l}$
<b>Volumen total</b>	<b>25 <math>\mu\text{l}</math></b>

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.

- 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
Influenza A Virus	FAM
Control interno endógeno (Endogenous Internal Control, EC)	HEX™ <sup>1</sup>
Referencia pasiva <sup>2</sup>	ROX™

1 Utilice la opción adecuada para su termociclador.

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

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

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

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

\* Recopilación de datos de fluorescencia, tiempo de análisis aproximado de 67 min (Mx3005P®, Agilent Technologies, Inc.)

# 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 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 19.

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

- La muestra emite una señal en los canales FAM y HEX.
- El Positive Control emite una señal en los canales FAM y HEX.
- El Negative Control no emite una señal en los canales FAM y HEX.

Tenga en cuenta que unas concentraciones muy elevadas de ARN del Influenza A Virus en la muestra pueden reducir la señal HEX o incluso suprimirla debido a la competición con el control interno.

---

<sup>1</sup> 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 Influenza A Virus y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:**

- La muestra emite una señal en el canal HEX, pero no en el canal FAM.
- El Positive Control emite una señal en los canales FAM y HEX.
- El Negative Control no emite una señal en los canales FAM y HEX.

Una señal HEX positiva significa que la extracción y la amplificación se han realizado correctamente, puesto que el gen constitutivo ( $\beta$ -actina) de la muestra se ha amplificado.

**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.

Si no se detecta una señal en los canales FAM (Influenza A Virus) y HEX (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 todos los canales para la reacción de 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 (Influenza A Virus)	HEX (EC)
Positivo para Influenza A Virus	X	X
Marcado positivo para Influenza A Virus	X	
Negativo para Influenza A Virus		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. 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 17.

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](http://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

Notas

## Notas

## Acuerdo de licencia limitada para el virotype Influenza A 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](http://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](http://www.indical.com).

**Marcas comerciales:** afosa®, bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, pigtype®, Svanovir®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); ABI PRISM® (Applied Biosystems); FAM™, HEX™, JOE™, ROX™ (Life Technologies Corporation); Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH); Mx3005P® (Agilent Technologies, Inc.). 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-2577-ES-001 © 2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

## Índice de cambios

Manual	Versión	Cambio
HB-2577-EN-001	Septiembre de 2022	Lanzamiento de producto

**INDICAL**  
BIOSCIENCE

Pedidos: [www.indical.com/contact](http://www.indical.com/contact)  
Servicio técnico: [support@indical.com](mailto:support@indical.com)  
Sitio web: [www.indical.com](http://www.indical.com)