



## KIT MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE *Piscirickettsia salmonis* EN PECES

Para su uso en terreno

### Manual de Uso

#### Antecedentes

*Piscirickettsia salmonis* es una bacteria intracelular facultativa que afecta a salmones en cultivo durante la engorda en agua de mar, causando mortalidades aproximadamente luego de 15-21 días de infección. La bacteria puede ser detectada en varios tejidos del pez durante el desarrollo de la enfermedad, pero su detección se realiza básicamente en muestras de hígado y/o riñón. El diagnóstico presuntivo se realiza mediante el análisis anatomopatológico y, posteriormente, se confirma mediante la detección de la presencia de la bacteria.

#### Aplicación del producto

Wikigen-SRS® está diseñado para la detección molecular rápida y en terreno de la bacteria *P. salmonis* en ADN aislado desde muestras de tejido de peces con Piscirickettsiosis (SRS).

#### Descripción del producto

WikiGen SRS® es un kit molecular para la detección cualitativa de *P. salmonis* mediante un método de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos con polimerasas y recombinasas, seguida de un revelado mediante ensayo de flujo lateral. El kit de ensayo lateral tiene una línea control (C) y una línea de prueba o test (T) que no son visibles antes de ejecutar la prueba. La línea C es un control de procedimiento, por lo que una línea rosada siempre debe aparecer si la prueba se realizó de manera correcta. Una línea rosada será visible en la línea T cuando la muestra analizada contenga *P. salmonis*. Este es un resultado positivo.

El kit contiene todos los componentes desechables requeridos para ejecutar una prueba fácil y precisa. El kit consiste en cuatro etapas: 1) Toma de las muestras de tejido y preparación en papel filtro. 2) Extracción y purificación de ADN de *P. salmonis* desde tejido mediante papel filtro, el cual digiere las células y atrapa el ADN. 3) Amplificación de un fragmento específico de ADN de *P. salmonis* a temperatura ambiente mediado por enzimas polimerasas y recombinasas. 4) Detección de ADN amplificado mediante una cinta colorimétrica que reconoce el marcaje del amplicón. Las cuatro etapas se realizan en terreno y sin uso de equipamiento de laboratorio.

#### Contenido del kit

Cada kit de 10 reacciones incluye:

- 20 microtubos color amarillo con Buffer I de extracción de material genético.
- 20 microtubos color naranja con Buffer II de extracción de material genético.
- 10 microtubos color violeta vacíos.
- 10 microtubos color azul con mix de amplificación.
- 10 microtubos transparentes con enzimas liofilizadas.
- 10 dispositivos con tiras reactivas y sistema de detección ADN.
- 10 trozos de papel filtro para homogenización del tejido.
- 10 trozos de parafilm para homogenizar tejido contra el papel filtro.
- 10 pick para traspaso de papel filtro/muestra.

El usuario debe proveer el material de disección de tejidos y lápiz marcador de punta fina para rotular correctamente las muestras y un *timer*. Se recomienda el uso de guantes de látex.

## Almacenamiento y manejo

- Preferiblemente, guardar a temperatura de refrigeración (4°C). El kit es estable hasta la fecha marcada en la caja (alrededor de 30 días).
- A temperatura ambiente, el kit tiene una duración máxima de 15 días.
- Evitar la exposición a la luz solar directa.
- NO CONGELAR.

## Precauciones

El kit está diseñado para minimizar la contaminación cruzada entre muestras, pero el ensayo debe realizarse en un lugar limpio, con materiales y superficies limpias y desinfectadas, antes y después de cada uso. Se recomienda el uso de guantes.

## Colecta y preservación de muestras

- El kit se utiliza sobre tejidos blandos tales como hígado o riñón. Se requiere una muestra de entre 0,1 a 0,2 cm<sup>3</sup> para el análisis.
- Las muestras pueden preservarse a -20 °C, sin preservante, hasta su análisis.

## Protocolo Wikigen-SRS®

La Figura 1 muestra el esquema general del procedimiento de WikiGen-SRS®. En breve:

- Un trozo de tejido se dispone sobre un trozo de papel filtro. Se cubre con un trozo de *parafilm* y se aplasta para desintegrar el tejido. Se deja secar por 10 minutos.
- Se corta un trozo de entre 0,1 a 0,2 cm<sup>2</sup> de filtro embebido con el tejido utilizando el bisturí o tijera pequeña. El resto del filtro puede ser guardado como contramuestra por más de 2 meses a temperatura ambiente.
- Sumergir el trozo de filtro en el tubo amarillo con Buffer I utilizando el pick y mantener por 5 minutos. Utilizando el pick, trasladar el trozo de papel al segundo tubo amarillo con Buffer I y mantener durante 5 minutos.
- Utilizando el pick, trasladar el trozo de papel al primer tubo naranja con Buffer II

y mantener durante 5 minutos. Mover el trozo de filtro al segundo tubo naranja con Buffer II e mantener por 5 minutos.

- Utilizando el pick, disponer el trozo de papel filtro en el tubo seco de color violeta y dejar secar por 10 minutos.
- En el intertanto, disponer el contenido del tubo transparente dentro del tubo de color azul con la solución de amplificación y agitar. Finalmente, agregar el trozo de papel seco al tubo azul utilizando el pick, cerrar el tubo e incubar por 35 minutos, mezclando levemente de vez en cuando.
- Encajar tubo de amplificación cerrado en el área dispuesta en el casete de detección.
- Cerrar el casete y presionar el gatillo.
- Leer el resultado luego de 15 minutos.

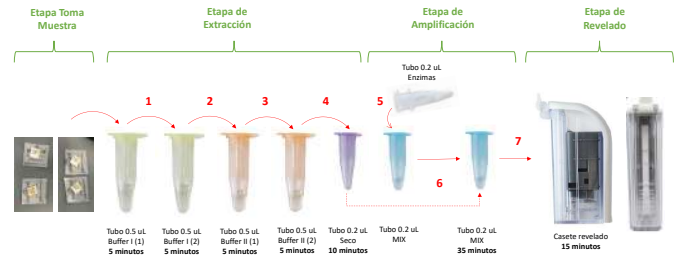


Figura 1. Procedimiento esquemático WikiGen-SRS®.

## Interpretación de resultados

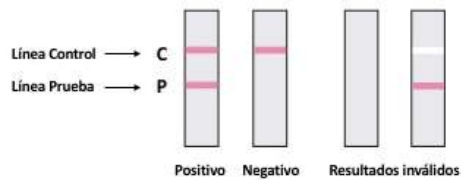
Un análisis correcto debe mostrar al menos la línea Control (C) (Figura 2), la cual presentará menor coloración al ser mayor la coloración de la línea Test (T).

**Resultado Positivo:** Aparecen dos bandas, la línea control arriba (C) y la línea de prueba abajo (T). La aparición de ambas líneas indica la presencia de *P. salmonis* en la muestra analizada.

**Resultado Negativo:** Aparece solo la banda control (C). La aparición de solo la línea control indica la ausencia de *P. salmonis* en la muestra analizada o que el número de copias del gen blanco de la bacteria está bajo el límite de detección del kit.

**Resultado inválido:** Si no aparece ninguna de las dos líneas en la cinta o aparece solo la línea T, los resultados son inválidos. Las recomendaciones de uso del kit podrían no haber sido seguidas correctamente o el kit podría estar deteriorado. En

ambos casos, se recomienda que la muestra sea analizada nuevamente.



**Figura 2.** Lectura e interpretación de resultados.

### Sensibilidad analítica

Wikigen-SRS® puede detectar hasta  $10^2$  UFC de la bacteria presente en la muestra de tejido extraída con el procedimiento.

### Limitaciones del test

Aunque Wikigen-SRS® tiene alta sensibilidad para detectar *P. salmonis*, se podrían presentar una baja incidencia de resultados falsos. En estos casos, otras pruebas confirmatorias serían requeridas.

### Referencias

- Del Río JS, Svobodova M, Bustos P, Conejeros P, O'Sullivan CK. Electrochemical detection of *Piscirickettsia salmonis* genomic DNA from salmon samples using solid-phase recombinase polymerase amplification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408:8611-8620.
- Rozas-Serri M, Ildefonso R, Peña A, Enríquez R, Barrientos S, Maldonado L. 2017. Comparative pathogenesis of piscirickettsiosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolt experimentally challenged with LF-89-like and EM-90-like *Piscirickettsia salmonis* isolates. *Journal of Fish Diseases* 40:1451-1472.

Fabricado por Newenko Group SpA.

Tel: +56 (65) 2773175

Email: [info@newenkogroup.cl](mailto:info@newenkogroup.cl)

[www.newenkogroup.cl](http://www.newenkogroup.cl)

Palena 280, Puerto Montt, Chile 5480000

