



FIND-IT BRSV



SISTEMA PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO BOVINO (BRSV) POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR EN TIEMPO REAL EN UN SOLO PASO.

FBRVS 50 - Sistema para **50** reacciones

FBRVS 100 - Sistema para **100** reacciones

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

FIND-IT BRSV es 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 virus Sincital Respiratorio Bovino. El ensayo emplea como blanco de amplificación la región más conservada del BRSV que es un segmento de la Glicoproteína N (gN).

El sistema emplea ARN obtenido de tejidos, suero, sangre o cultivos celulares. **FIND-IT BRSV** integra RT y PCR-TR en un **solo** paso, únicamente requiere agregar el ARN purificado de su muestra.

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 BRSV. Este sistema resulta extremadamente confiable, gracias a la incorporación de un **control interno que permite monitorear la presencia de sustancias inhibitorias y descartar falsos negativos**. Así mismo se incluye un **control estándar para cuantificar el número de moléculas**.

El virus Sincital Respiratorio Bovino, es un *Paramixovirus* del genero *Pneumovirus*. Afecta principalmente a terneros recién destetados y vaquillas causando neumonía, edema intersticial pulmonar y enfisema. Es un agente involucrado en el complejo neumónico de los terneros, el cual ocasiona una alta morbilidad y mortalidad para la industria ganadera.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

La RT-PCR-TR es una herramienta de diagnóstico molecular sensible, específica y robusta. Este sistema, se basa en la amplificación selectiva de un segmento del genoma viral 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 detección de fluorescencia.

Esta sonda TaqMan es un oligonucleótido que posee dos moléculas (reportera-fluorescente y apagadora) que están colocados en los extremos, en ésta condición no se genera fluorescencia ya que la segunda inhibe a la primera. Cuando la sonda hibrida específicamente al producto de amplificación, ésta es degradada por la acción 5' exonucleasa de la ADN Taq polimerasa. Cuando esto sucede, se separa la molécula reportera fluorescente alejándose de la actividad apagadora de la otra molécula, generándose fluorescencia. La sonda hibrida específicamente al producto de amplificación lo cual hace al sistema sumamente específico 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 cultivos celulares.

CONTENIDO DEL SISTEMA

1.- Super Mix RT-PCR-TR 2X* (500µl) (oligonucleótidos y sondas TaqMan, ADNTaqPolimerasa, amortiguador, dNTP`s, MgCl₂, Transcriptasa Reversa [Moloney Murine Leukemia Virus], Inhibidor de RNAsas y H₂O).

2.- ADN control estándar de cuantificación para BRSV (1ng/µl = 3.16 X 10⁸/µl) (50µl)

4.- H₂O DEPC (500 µl)

El sistema contiene iniciadores y sonda TaqMan para amplificar un control interno que permite monitorear la presencia de sustancias inhibitorias y descartar falsos negativos.

El sistema también incluye un ADN control estándar que permite construir una curva de referencia para cuantificar de forma absoluta el número de copias virales presentes en la muestra

La sonda TaqMan para la detección del BRSV está marcada con Fluor Orange 560/ BHQ1 (naranja), la sonda del control interno está marcada con FAM/TAMRA (verde).

*Almacenamiento a -20°C

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- 1.- Añada hasta 10 µl de la muestra de RNA 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.- Somete 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) y 585 - 610 nm (naranja).

CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GENOMA VIRAL

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del BRSV, se recomienda amplificar 4 diferentes cantidades conocidas del ADN control estándar. Para esto, se deben realizar 4 diluciones decuples seriadas, a partir del ADN control estándar proporcionado (10ng/ul). Por lo que 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. 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.

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.

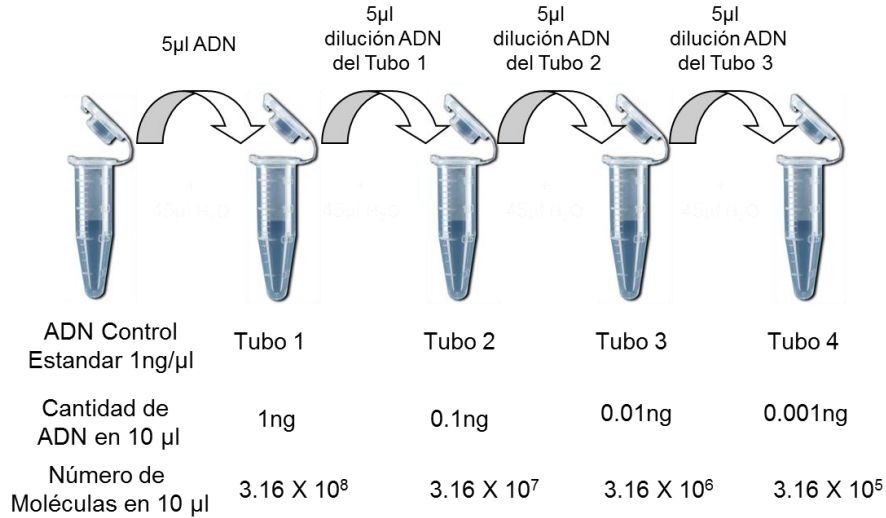


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

Material Requerido No Proporcionado

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

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.

Referencias

Larsen, LE. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review, Acta Vet. Scand. 41 (2000), pp. 1–24.M.P.