



FIND-IT DVB



SISTEMA PARA LA DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (DVB) GENOTIPO 1 Y 2 POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR EN TIEMPO REAL EN UN SOLO PASO.

FDVB 50 - Sistema para **50** reacciones

FDVB 100 - Sistema para **100** reacciones

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

FIND-IT DVB es un sistema basado en Transcripción Reversa (RT) y Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR) para detectar, cuantificar y diferenciar la presencia del virus del DVB genotipo 1 y 2. El ensayo emplea como blanco de amplificación la región más conservada del virus de la DVB que es un segmento de la Glicoproteína E (gE).

El sistema emplea ARN obtenido de tejidos, suero, sangre o cultivos celulares. **FIND-IT DVB** 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 virus de la DVB. El sistema **incluye un ADN estándar de cuantificación que permite la cuantificación absoluta del virus de DVB**. Este ADN además sirve como control positivo del ensayo. 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**

El virus de la diarrea Viral Bovina (BVDV) es un pestivirus de la familia de las Flaviviridae, muy relacionado con los virus de la fiebre clásica porcina y de la enfermedad ovina de la frontera. Existen dos genotipos antigénicamente distintos de DVB, genotipos 1 y 2. El DVB de ambos genotipos puede darse en formas no citopática y citopática (biotipos), clasificadas en función de si produce o no cambios visibles en los cultivos celulares. Generalmente, el que circula en poblaciones de ganado es el biotipo no citopático. Cada biotipo tiene un papel específico en una variedad de síndromes clínicos – infecciones crónicas, agudas y congénitas. Los virus del tipo 2 son generalmente no citopáticos y se han asociado

con brotes de infección aguda severa. Las infecciones subclínicas son comunes con ambos genotipos.

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.

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). 50 reacciones/vial.
- 2.- ADN controles estándares de cuantificación para DVB genotipo 1 y 2 (1ng/µl para cada uno = 2.99×10^8 copias/µl) (50µl o 100 µl).
- 3.- H₂O DEPC (500 µl)

La sonda TaqMan para la detección del virus de **DVB genotipo 1** está marcada con **VIC/BHQ2 (amarillo)** y del **genotipo 2 con FAM/TAMRA (verde)**. El **control interno está marcado con CAL Fluor Red (rojo)**.

El sistema contiene ADN controles estándares de cuantificación para cada genotipo (en el mismo tubo), lo que permite construir una curva de referencia para cuantificar de forma absoluta el número de copias virales presentes en la muestra para cada genotipo.

*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 H_2O 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), 590 – 610 (rojo).

CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GENOMA VIRAL

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del virus de DBV genotipo 1 y 2, se recomienda amplificar 4 diferentes cantidades conocidas de los ADN controles estándares. Para esto, se deben realizar 4 diluciones decuples seriadas, a partir del ADN control estándar proporcionado (10ng/ μl). Por lo que se colocan en 4 tubos 45 μl de H_2O y se toman 5 μl del ADN control estándar (genotipo 1 y 2), agregándolo al primer tubo, se homogeniza la mezcla utilizando un agitador tipo vortex y se toman 5 μl para agregarlo al 2º tubo y así sucesivamente. Para realizar la curva estándar de amplificación, se toman 10 μl de cada dilución, se le agregan 10 μl de la Super Mix RT-PCR-TR y se somete a las condiciones recomendadas de amplificación.

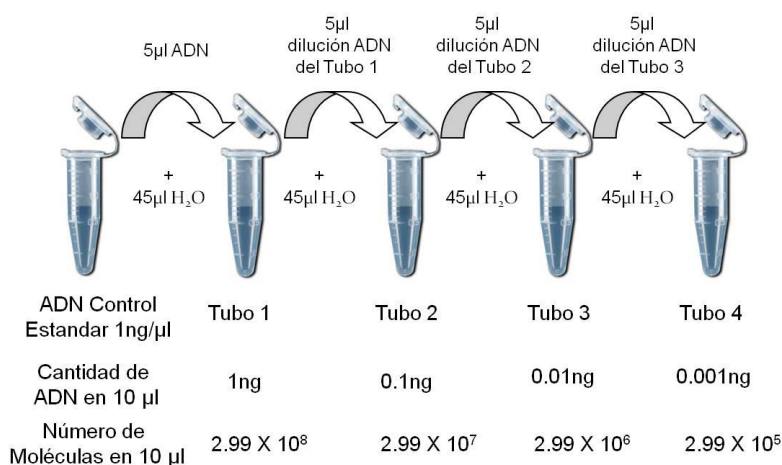


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

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

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.

BIBLIOGRAFÍA

OIE. 2004 Diarrea Vírica Bovina. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.10.6. Disponible en línea: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.06_Diarrea_virica_bovina.pdf