



FIND-IT PRRS



Sistema para la detección y cuantificación del virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) por Transcripción Reversa y PCR en Tiempo Real en un solo paso.

FP 50 – Find-IT PRRS: Sistema para **50** reacciones.

FP 100 – Find-IT PRRS: Sistema para **100** reacciones.

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

FIND-IT PRRS es un sistema basado en Transcripción Reversa (RT) y Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR) en un solo paso, para detectar y cuantificar la presencia del virus del PRRS. **El ensayo emplea como blanco de amplificación la región más conservada del virus del PRRS que es la región 3´no codificante.**

El sistema emplea ARN obtenido de tejidos, fluidos o exudados y cultivos celulares. **FIND-IT PRRS** integra RT y PCR-TR en un **solo** paso, únicamente requiere agregar el ARN purificado de su muestra. Este sistema, tiene la capacidad de detectar y cuantificar el virus del PRRS, 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 del PRRS en un solo paso. 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 sistema 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 PRRS tiene una sensibilidad para detectar de 10 a 100 partículas virales por reacción.

El kit es sumamente fácil de usar, contiene los ingredientes necesarios para 100 reacciones que permiten amplificar, detectar y cuantificar el virus de PRRS.

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 del PRRS es de ARN, es necesario para su identificación obtener primero el ARN de la muestra, generar copias de ADN complementario (cDNA), posteriormente amplificarlo y detectarlo por PCR-Tiempo Real. En la detección selectiva, de un segmento diagnóstico del virus del PRRS, 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 un fluoróforo en el extremo 5' y un apagador en el extremo 3', que al estar en los extremos del oligonucleótido, no generan fluorescencia ya que se el segundo inhiben al primero. 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 del 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.

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, ADN del control interno y H₂O). 50 reacciones/vial.
- 2.- ADN control estándar* (1ng/µl = 3.04 X 10⁸ moléculas/ng) (50µl o 100 µl)
- 3.- H₂O DEPC (500 µl)

La sonda TaqMan para la detección del virus de PRRS está marcada con HEX/BHQ1 (amarillo). La sonda del control interno (gen M VIA) está marcada con FAM/TAMRA (verde).

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 495 – 520 (verde) y 535 - 556 nm (amarillo).

CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CUANTIFICACIÓN

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del virus de PRRS, se recomienda amplificar 4 diferentes cantidades conocidas del ADN control estándar. Para esto, se deben realizar 4 diluciones décuples 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.

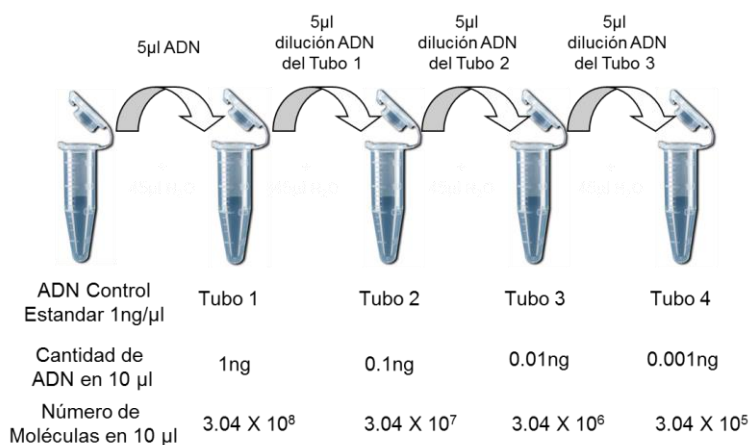


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

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.

Extracción de ARN

Siga las recomendaciones del kit o técnica de extracción de ARN que utilice.