



## FIND-IT PCV2



**FPCV2 50** - Sistema para **50** reacciones  
**FPCV2 100** - Sistema para **100** reacciones

### **SISTEMA PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2) POR PCR EN TIEMPO REAL.**

#### **DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.**

**FIND-IT PCV2** es un sistema basado en una Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR) para detectar y cuantificar la presencia del circovirus porcino tipo 2 (PCV2). El ensayo emplea como blanco de amplificación la región más conservada del ORF2.

**FIND-IT PCV2** incluye iniciadores y sondas TaqMan, así como los reactivos que permiten amplificar, detectar y cuantificar el PCV2. El sistema emplea ADN obtenido de tejidos, suero, sangre o cultivos celulares. Únicamente se requiere agregar el ADN purificado de su muestra a la mezcla de reacción.

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.

Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) se distribuye en todo el mundo en hatos porcinos y es una causa importante de pérdidas económicas para la industria porcina. Es considerado un agente asociado a una serie de enfermedades (PCVAD). Enfermedades específicas que se incluyen bajo este término incluye; problemas entéricos, respiratorios, abortos, inmunodepresión, así como el síndrome de emaciación multisistémico postdestete (PMWS) y el síndrome dermatitis - nefropatía (PDNS). Sin embargo, PMWS es una enfermedad multifactorial donde el PCV2 es necesario pero no suficiente para su desarrollo. Cerdos sanos también pueden estar infectados con PCV2, pero estos cerdos llevan cargas virales más bajas que los animales enfermos. Por lo tanto hay una necesidad urgente de métodos específicos y eficaces para detectar el virus.

#### **PRINCIPIO DEL ENSAYO**

La 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 PCR-TR 2X\* (500µl) (oligonucleótidos y sondas TaqMan, ADNTaqPolimerasa, amortiguador, dNTP`s, MgCl, y H<sub>2</sub>O). 50 reacciones/vial.
- 2.- ADN control estándar de cuantificación para PCV2 (1ng/µl = 2.99 X 10<sup>8</sup>/µl) (50µl).
- 3.- H<sub>2</sub>O (500 µl).

\*Almacenamiento a -20°C

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 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 PCV2 está marcada con Cy5/BHQ3 (Rojo); la sonda del control interno está marcada con FAM/TAMRA (Verde).**

## **PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO**

- 1.- Añada hasta 10 µl de la muestra de DNA en un tubo. Cuando sea necesario complemente a un volumen de 10 µl con H<sub>2</sub>O.
- 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) y 656 - 670 nm (rojo).**

### CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GENOMA VIRAL

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del virus de la LB, 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 H<sub>2</sub>O 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 PCR-TR y se somete a las condiciones recomendadas de amplificación. Estos ensayos es recomendable hacerlos por duplicado.

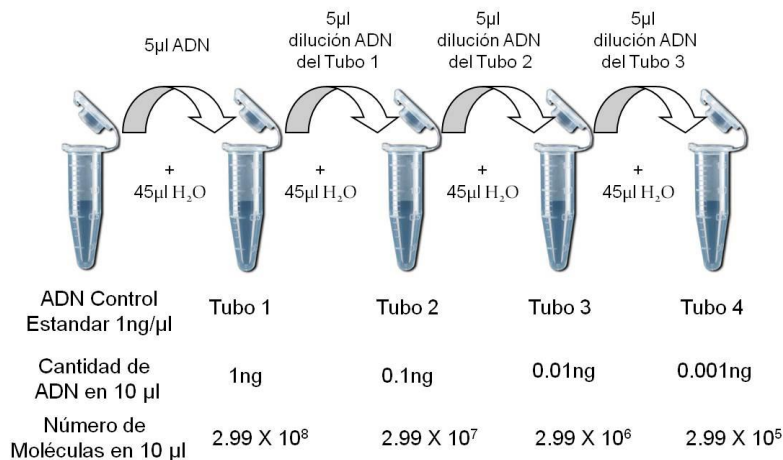


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

### 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 ADN

Micropipetas y puntas

Vortex

Microtubos para las reacciones de PCR-TR

Termociclador en Tiempo Real.

### **Extracción de ADN**

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

Suspender el ADN en un volumen de 50ul con H<sub>2</sub>O.

### **BIBLIOGRAFIA**

Fenner's Veterinary Virology 4Th edicion 2016. N. James Maclachlan y Edward J Dubovi