



FIND-IT LB



FLB 50 - Sistema para **50** reacciones

FLB 100 - Sistema para **100** reacciones

SISTEMA PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA (LB) POR PCR EN TIEMPO REAL.

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

FIND-IT LB es un sistema basado en una Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR) para detectar y cuantificar la presencia del virus de la Leucosis Bovina. El ensayo emplea como blanco de amplificación la región más conservada del virus de la LB es un segmento de la Polimerasa viral (pol).

El sistema emplea DNA obtenido de tejidos, suero, sangre o cultivos celulares.

FIND-IT LB incluye iniciadores y sondas TaqMan, así como los reactivos que permiten amplificar, detectar y cuantificar el virus de la LB. 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.

El virus de la Leucosis Bovina, es un miembro oncogénico del género *Deltaretrovirus* de la familia *Lentivirus*. La mayoría de los animales infectados por este virus nunca muestran signos hemáticos de infección y se convierten en portadores asintomáticos del virus. Sólo del 5 al 10% de los animales infectados, desarrollan linfosarcoma maligno monoclonal de células B. Con distribución mundial, la leucosis bovina está enlistada en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una enfermedad de importancia para el comercio internacional y está incluido en programas nacionales de erradicación en Australia y en algunos Estados miembros de la Unión Europea, recientemente varias de los cuales han eliminado la enfermedad. En contraste, el 89% de los rebaños lecheros en los Estados Unidos se reportan estar infectados y las pérdidas económicas se han estimado en 525 millones de dólares anuales por disminución en el rendimiento lácteo.

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 esta 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, MgCl, y H₂O). 50 reacciones/vial.
- 2.- ADN control estándar de cuantificación para LB (1ng/µl = 2.99 X 10⁸/µl) (50µl).
- 3.- H₂O (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 virus de la LB está marcada con HEX/BHQ1 (amarillo), 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_2O .
- 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 535 - 556 nm (amarillo).

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/ μl). Por lo que se colocan en 4 tubos 45 μl de H_2O y se toman 5 μl del ADN control estándar, 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. Estos ensayos es recomendable hacerlos por duplicado.

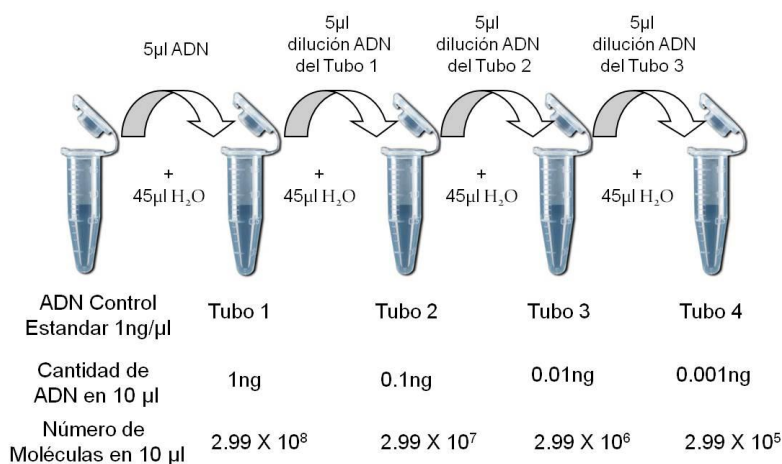


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

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 H₂O.

BIBLIOGRAFIA

Kettmann R, Portetelle D, Mammerickx M, Cleuter Y, Dekegel D, Galoux M, Ghysdael J, Burny A, Chantrenne H (1976) Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. Proc Natl Acad Sci USA 73:1014–1018

Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerick M, Willens L, Portetelle D (1994) Bovine leukaemia virus. In: Levy JA (ed) The retroviridae. Plenum Press, New York, pp 39–81.

Ott SL, Johnson R, Wells SJ: Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. Prev Vet Med 2003, 61:249-262.

http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapter_1.11.11.htm.2

<http://nahms.aphis.usda.gov/dairy/dairy96/DR96blv.pdf>