



# FIND-IT DISTEMPER



**Sistema para la detección del virus de Distemper canino por Transcripción Reversa Y PCR en Tiempo Real en un solo paso.**

**FDC 50** - Sistema para **50** reacciones

**FDC 100** - Sistema para **100** reacciones

## DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

**FIND-IT DISTEMPER** 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 de Distemper. El ensayo emplea como blanco de amplificación un segmento de la nucleocápside, que es la región más conservada del virus de Distemper canino.

El sistema emplea ARN obtenido de tejidos, sangre, líquidos alantoideos o cultivos celulares. **FIND-IT DISTEMPER** integra RT y PCR-TR en **un solo** paso, únicamente requiere agregar el ARN purificado de su muestra. Este sistema, tiene la capacidad de diagnosticar el virus de Distemper canino, a partir de muestras clínicas en medicina veterinaria.

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 Distemper canino en **un solo paso**. Este sistema resulta extremadamente confiable, gracias a la incorporación de un control interno, el cual siempre amplifica, que permite monitorear la presencia de sustancias inhibitorias y descartar falsos negativos. El sistema incluye un ADN estándar de cuantificación que permite la cuantificación absoluta del virus de Distemper canino. Este ADN además sirve como control positivo del ensayo.

## ANTECEDENTES

El virus de Distemper canino (CDV), también conocido como Moquillo canino, presenta una distribución mundial, origina una enfermedad aguda, febril, altamente contagiosa la cual afecta principalmente al sistema respiratorio, gastrointestinal y nervioso. Infecta animales de todas las edades, siendo particularmente vulnerables los cachorros y animales viejos, donde produce un cuadro conocido como "encefalitis del perro viejo"<sup>1, 2</sup>.

La ruta más importante de transmisión es a través de aerosoles. La eliminación de virus comienza aproximadamente al séptimo día post infección (PI). Los animales infectados eliminan el virus mediante secreciones corporales independientemente de la presencia de signos clínicos.

El CDV pertenece a la familia Paramyxoviridae, género Morbillivirus<sup>1</sup>. Es un virus envuelto, RNA monocatenario, lineal, de sentido negativo. Su genoma de 15 kb codifica para 6 proteínas estructurales y 2 no estructurales. Las proteínas estructurales son la proteína de la Nucleocápside (N), Fosfoproteína (P), Proteína Polimerasa Mayor (L) conformando un complejo denominado Ribonucleoproteína (RNP), la proteína de Matriz (M) asociada a la envoltura viral, la Hemaglutinina (H) y la proteína de Fusión (F) ambas glicoproteínas localizadas en la envoltura viral. El gen de la nucleoproteína es de los más conservados del genoma viral, por lo que es el blanco de amplificación de pruebas moleculares como la RT-PCR-TR-

### **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 de Distemper canino es de ARN, es necesario para su identificación obtener primero el ARN de la muestra, generar una copia de ADN complementario (cDNA) y posteriormente amplificarla y detectarla por PCR-Tiempo Real. En la detección selectiva, de un segmento diagnóstico del virus de Distemper canino, 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 dos fluoróforos que al estar en los extremos del oligonucleótido, no generan fluorescencia ya uno inhibe al otro. 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 de otro 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, MgCl<sub>2</sub>, Transcriptasa Reversa [Moloney Murine Leukemia Virus], Inhibidor de RNAsas y H<sub>2</sub>O).

2.- H<sub>2</sub>O DEPC (500 µl)

3.- 50 µl de ADN control (1 ng/µl)

**La sonda TaqMan para la detección del virus de Distemper canino está marcada con HEX/TAMRA (amarillo). La sonda para el control interno está marcada con FAM/BHQ-0 (verde).**

\*Almacenamiento a -20°C

## **PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO**

1.- Añada hasta 10 µl de la muestra de RNA en un tubo de PCR. Cuando sea necesario complemente a un volumen de 10 µl con H<sub>2</sub>O 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).**

## **CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CUANTIFICACIÓN**

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del virus del Distemper Canino, se recomienda amplificar 4 diferentes cantidades conocidas del ADN control estándar de cuantificación. 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 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. 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.

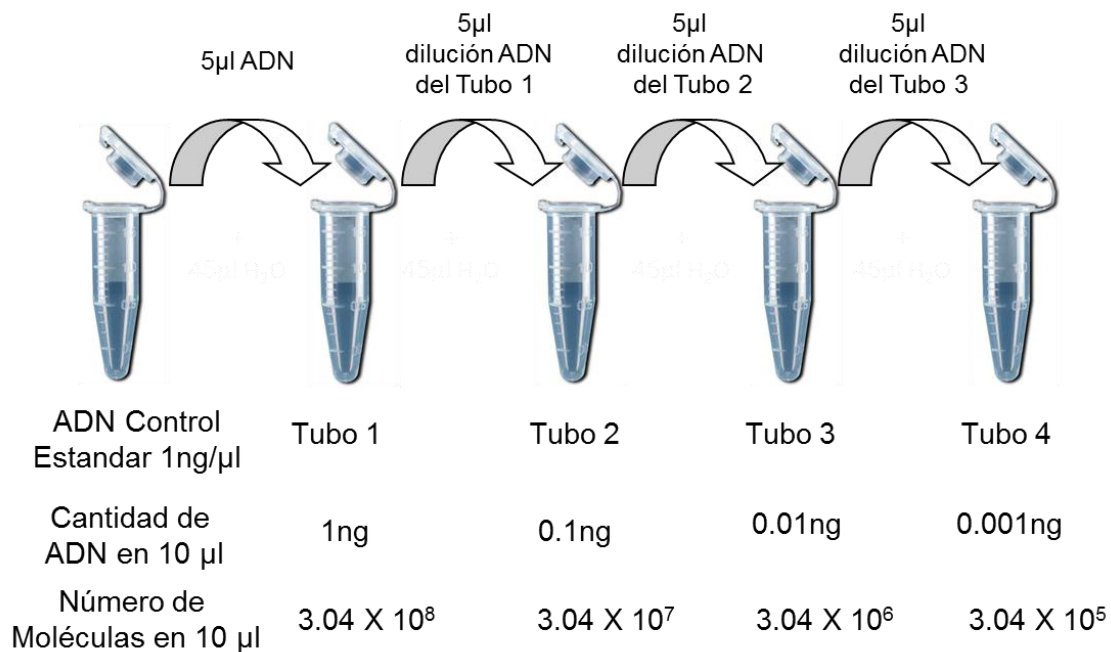


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de cuantificación. Se indica la cantidad de ADN que resulta en cada dilución y el No de moléculas.

### 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.

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

### **Bibliografía citada**

- 1.- Beineke A., Puff C., Seehusen F., W. Baumga'rtner. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009. 127; 1–18.
- 2.- Andrew MQ King, Elliot Lefkowitz. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Editorial Elsevier. 1ª Edición. Estados Unidos de América. 2011.