



FIND-IT Newcastle



Kit para la detección del virus de la Enfermedad de Newcastle por Transcripción Reversa y PCR en Tiempo Real en un solo paso.

FN 50 – FIND-IT Newcastle Sistema para **50** reacciones

FN 100 - FIND-IT Newcastle - Sistema para **100** reacciones

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

FIND-IT Newcastle 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 la enfermedad de Newcastle. El ensayo emplea como blanco de amplificación la región más conservada del gen M de este virus (que codifica para la proteína de la matriz). Este ensayo ha sido validado por el USDA y es ampliamente usado en USA, Canadá y Europa⁶.

El sistema emplea ARN obtenido de tejidos, líquidos alantoideos y cultivos celulares. **FIND-IT Newcastle** 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 la enfermedad de Newcastle, 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 la enfermedad de Newcastle, 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 Newcastle 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 50 reacciones que permiten amplificar, detectar y cuantificar el virus de Newcastle tipo A.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Newcastle es una enfermedad de declaración obligatoria por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) que afectan a muchas especies de aves y causa graves pérdidas económicas en aves comerciales.

El virus de la enfermedad de Newcastle es un *Paramixovirus Aviar 1* que se clasifica dentro de la subfamilia *Paramyxovirinae* en la familia *Paramyxoviridae* y pertenece al género *Avulavirus*^{1,2}. Su genoma, mide aproximadamente 15 kb, es de ARN de cadena simple con sentido negativo, el cual codifica para ocho proteínas: RNA polimerasa (L), hemaglutinina-neuraminidasa (HN), proteína de fusión (F), proteína de matriz (M), fosfoproteína (P) y nucleoproteína (N). Tiene una nucleocápside con simetría helicoidal (13-18 nanómetros) y una envoltura lipídica derivada de la membrana celular. El virión tiene un diámetro de 150 nanómetros^{1,2}.

Aislamientos virales de la enfermedad de Newcastle se clasifican en base a su virulencia en pollos en tres patotipos, dependiendo de la severidad de la enfermedad. Lentogénicos, son de baja virulencia y puede causar manifestaciones respiratorias y entéricas leves. Mesogénicos, causan enfermedades respiratorias primarias. Velogénicos, son cepas que causan alta mortalidad, estas se clasifican en neurotrópicas y vicerotrópicas basado en su manifestación patológica^{1,2,3}.

La hemaglutinina-neuraminidasa contribuye a propagar al virus en el hospedero⁴, pero se sabe que la proteína de fusión es la que participa en mayor proporción a la virulencia de esta enfermedad⁵. La región más conservada del genoma de este virus es la proteína de la matriz (M)⁶.

El aislamiento viral en embrión de pollo seguido de la inhibición de la hemoaglutinación con anticuerpos específicos, representa la referencia estándar para la detección de los virus⁷. Aunque el aislamiento viral es un método muy sensible y específico, un diagnóstico de rutina se lleva a cabo en varios días. Actualmente, el método de elección en el diagnóstico y cuantificación de la virus de la enfermedad de Newcastle, debido a su rapidez, niveles de sensibilidad y especificidad, es la detección molecular empleando RT y PCR-TR en un **solo** paso como el que brinda el sistema **FIND-IT Newcastle**.

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 Newcastle 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 Newcastle, 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 que se inhiben mutuamente. 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 KIT

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).

2.- ADN estándar de cuantificación * (1ng/µl = 2.99×10^8 moléculas/µl) (25µl)

3.- H₂O DEPC (500µl)

La sonda TaqMan para la detección del virus de Newcastle está marcada con HEX/BHQ1 (amarillo). La sonda del control interno 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 complementa 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 nm (verde) y 535 - 556 nm (amarillo).

CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CUANTIFICACIÓN

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del virus de Newcastle, 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.

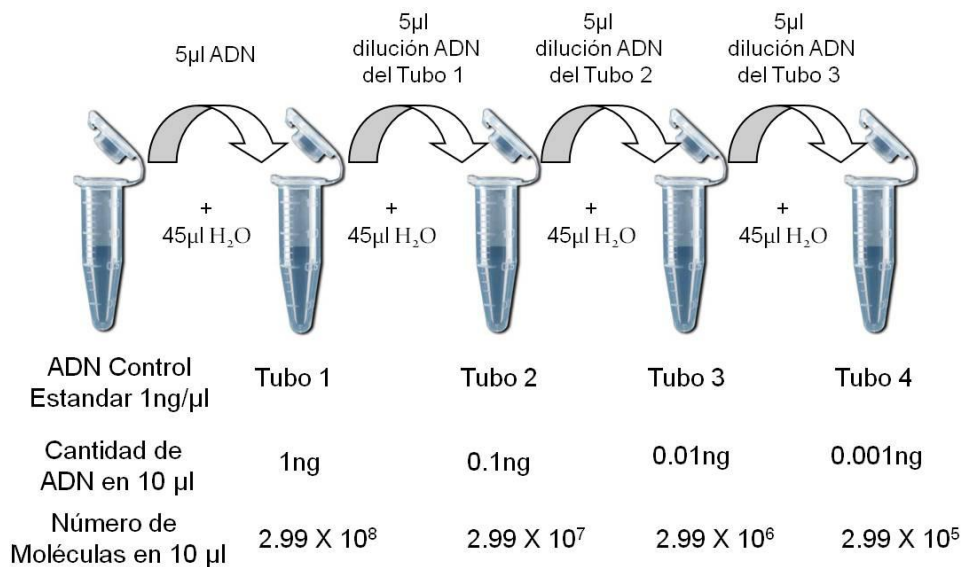


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

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.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Flint SJ, Emquist LW, Racaniello VR and Skalka AM. Principles of Virology. Second Edition. ASM PRESS. 2004.
- 2.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>
- 3.- Piacenti AM, King DJ, Seal BS, Zhan J, Brown CC. Pathogenesis of Newcastle Disease in Commercial and Specific Pathogen-free Turkeys Experimentally Infected with Isolates of Different Virulence. Vet Pathol. 2006;43:168–178.
- 4.- Huang Z, Panda A, Elankumaran S, Govindarajan D, Rockemann DD, Samal SK. The hemagglutinin neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. Journal of Virology. 2004;78:4176-4184.
- 5.- Panda A, Huang Z, Elankumaran S, Rockemann DD, Samal SK. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. Microbial Pathogenesis. 2004;36:1-10.
- 6.- Wise MG, Suarez DL, Seal BS, Pedersen JC, Senne DA, King DJ, Kapczynski DR, Spackman E. Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42:329–338
- 7.- OIE. 14 August 2009, posting date. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2008. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm.

ANEXO

Toma, envío y procesamiento de la muestra

Colección de la muestra

- 1.-Inserte un hisopo seco en alguno de los orificios nasales o dentro del área nasofaríngea.
- 2.-Presione suavemente el hisopo contra la pared de la mucosa nasal, permitiendo que el hisopo absorba las secreciones.
- 3.-Rotar el hisopo dos o tres veces y retirarlo.
- 4.-Colocar el hisopo en un tubo estéril con 2 ó 3ml de medio de transporte viral.
- 5.-Rompa el palo del hisopo y cierre el tubo.

Transporte de la muestra

Emplee refrigerantes para mantener una temperatura de 2 a 10°C.

Almacenamiento de las muestras

Almacenar a 2 a 10°C hasta por 72hrs antes de procesarlo. Almacenar a - 72°C por periodos más prolongados.

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 H₂O DEPC.