

UTILIZACIÓN DE LAS TARJETAS FTA[®] PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN MUESTRAS DE FLUIDO ALANTOIDEO

Utilization of FTA[®] Cards for the Molecular Diagnostic of Newcastle Disease Virus in Allantoic Fluid Samples

Francisco Perozo¹, Pedro Villegas², Iván Alvarado², Carlos Estévez³, Sergio Rivera¹ y Yaneth Mavárez¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo 4005-A, Venezuela. E-mail: frankperozo1@latinmail.com

²Poultry Diagnostic and Research Center, University of Georgia.

³Southeastern Poultry Research Laboratory USDA. Apartado 15252, Athens, Georgia.

RESUMEN

Se evaluó la factibilidad de utilizar las tarjetas FTA[®] (Flinders Technology Associates) para la inactivación y transporte de fluido alantoideo infectado con el virus de la enfermedad de Newcastle (VEN). Las tarjetas FTA[®] fueron impregnadas con diluciones seriadas de fluido alantoideo con un título inicial de 10^{8,8} DL₅₀ del VEN cepa LaSota y analizadas mediante la prueba de reacción en cadena por la polimerasa transcriptasa reversa (por sus siglas en inglés RT-PCR) a las 24 horas, 7 y 14 días. La concentración más baja del virus detectada en el fluido alantoideo fue 10^{5,8} DL₅₀. La detección del virus a partir de la tarjeta fue posible hasta 14 días después de su inactivación. El re-aislamiento viral en huevos embrionados a partir de las tarjetas resultó negativo. La inactivación del virus en las tarjetas no afectó la calidad de la secuencia de nucleótidos, permitiendo la determinación de su virulencia mediante la secuenciación de los nucleótidos que codifican la zona de corte de la proteína de fusión resultando ser lentogénico en concordancia con la cepa inicial de virus aplicada a las tarjetas. Se concluye que las tarjetas FTA[®] representan una alternativa válida para el muestreo, inactivación y diagnóstico molecular del VEN, con un alto grado de bioseguridad.

Palabras clave: Virus de la enfermedad de Newcastle, tarjetas FTA[®], inactivación, detección molecular.

ABSTRACT

The feasibility of using FTA[®] cards (Flinders Technology Associates) for inactivation and transportation of allantoic fluid infected with Newcastle disease virus (NDV) was evaluated. Serial dilutions of allantoic fluid with a titer of 10^{8.8} ELD₅₀ of LaSota strain NDV were loaded on the FTA[®] cards and analyzed after 24 hour, 7 and 14 days using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The lowest virus concentration that could be detected from the FTA[®] cards was 10^{5.8} ELD₅₀. The detection of the inactivated virus was possible after 14 days of virus inactivation. No virus re-isolation in embryonating eggs was possible from the cards. No negative effects of the FTA[®] card inactivation on the nucleotide sequences were observed, allowing the determination of its virulence by direct nucleotide sequencing of the F protein cleavage site, resulting in a lentogenic strain in concordance with the initial virus applied on the cards. It can be concluded that FTA[®] cards are a valid alternative for NDV sampling, inactivation and molecular diagnostic with a high degree of biosecurity.

Key words: Newcastle disease virus, FTA[®] cards, inactivation, molecular detection.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle afecta más de 236 especies de aves, tiene una distribución mundial y es una enfermedad de declaración obligatoria, su sintomatología va desde reacciones respiratorias leves y depresión, hasta mortalidades por encima del 80% en parvadas comerciales [1]. La presencia en Latinoamérica de cepas velogénicas del virus de la enfer-

medad de Newcastle (VEN) con un patrón epidemiológico de endemia, es una de las preocupaciones máximas de la industria avícola [17]. La implementación de técnicas de diagnóstico molecular como herramientas en la identificación y vigilancia epidemiológica del agente causal de la enfermedad, se constituye en un área activa de investigación.

El VEN es un virus ARN encapsulado, de cadena simple y de sentido negativo que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, que recientemente fue ubicado en el nuevo género *Avulavirus*, estableciéndose así una separación definitiva entre los paramixovirus aviares y los *Rubulavirus* de mamíferos [2, 14]. El virus posee un genoma no segmentado que codifica para 6 proteínas estructurales: hemoaglutinina-neuraminidasa (HN), proteína de fusión (F), nucleocápside (NP), matriz (M), polimerasa (L) y fosfoproteína (P) [1, 14]. La proteína de fusión es sintetizada como un precursor inactivo (Fo), el cual debe ser separado enzimáticamente para que se active y se generen las porciones F₁ y F₂, lo que permite la dispersión del virus de célula a célula. Los virus velogénicos presentan fenilalanina en la posición 117 y una mayor cantidad de aminoácidos básicos en el sitio de corte de la proteína de fusión, lo cual es reconocido específicamente por la proteasa furina, que se encuentra distribuida en un amplio rango de tejidos en el ave, haciendo más eficiente la colonización de los virus velogénicos [1, 10, 13]. De allí la importancia de identificar y caracterizar esta porción del genoma viral.

La manipulación y transporte de VEN de alta patogenicidad, representa un riesgo potencial para la diseminación de la enfermedad, por lo que se deben tomar todas las medidas de bioseguridad que permitan el traslado seguro de muestras entre laboratorios.

Durante los últimos años se ha ensayado la utilización de tarjetas de papel de filtro Flinders Technology Associates (tarjetas FTA[®]) producidas y comercializadas por Whatman[®] Internacional Ltd. Reino Unido., para la inactivación y traslado de microorganismos [9, 11, 15], incluso algunos patógenos aviares tales como *Mycoplasma* y el virus de la bronquitis infecciosa [7, 8]. Las tarjetas FTA[®], están constituidas de una membrana de celulosa que contiene químicos liofilizados capaces de inactivar un amplio rango de microorganismos preservando sus ácidos nucleicos [3, 12, 15]. Las muestras obtenidas de las tarjetas pueden ser procesadas en el laboratorio a partir del virus inactivado en el papel de la tarjeta. El objetivo de este trabajo fue demostrar las ventajas de utilizar tarjetas FTA[®] para la inactivación, transporte, diagnóstico molecular del VEN en muestras de fluido alantoideo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus

Una vacuna liofilizada contra el VEN (tipo I, cepa LaSota) fue diluida según las recomendaciones del fabricante

(Merial Select, Gainesville, EUA) y 0,1 mL inoculados en la cavidad alantoidea de huevos embrionados libres de patógenos específicos (white leghorns) de nueve días de edad (Merial Select, Gainesville, EUA). Pasadas 72 horas, el fluido alantoideo proveniente de los embriones inoculados se tituló según la técnica descrita por Villegas [18]. La concentración inicial del virus en el fluido alantoideo utilizado en el ensayo fue de $1 \times 10^{8.8}$ DL₅₀/mL. De este fluido alantoideo, se realizaron nueve diluciones seriadas (1 en 10) utilizando agua estéril y libre de ARNasas (Quiagen Sciences. Maryland, EUA). Alícuotas de 50 µL de cada una de las diluciones se aplicaron a las tarjetas y otras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Detección del VEN a partir de las tarjetas FTA[®]

Con la finalidad de determinar el título del VEN más bajo que puede ser detectado en fluido alantoideo a partir de las tarjetas FTA[®], se realizó la prueba de transcriptasa reversa-reacción en cadena por la polimerasa (por sus siglas en inglés RT-PCR) para cada una de las diluciones de fluido alantoideo muestreadas. El procedimiento se repitió los días 7 y 14, para evaluar la capacidad de las tarjetas de preservar el ARN viral en la matriz de la mismas luego de inactivado y permitir la detección del virus luego de un tiempo de almacenaje oportuno para el traslado de las muestras hacia los laboratorios.

Extracción y amplificación del ácido ribonucleico del VEN

Se extrajo la matriz de la tarjeta impregnada con el virus, para ser resuspendida en 200 µL del buffer de extracción (Whatman International, Ltd. Reino Unido) y colocada en hielo por 15 minutos, mezclando vigorosamente cada 5 minutos. La fase líquida obtenida, así como 50 µL del fluido alantoideo homólogo al colocado en las tarjetas (fluido control positivo), fueron sometidos a un proceso de extracción de ARN empleando Trizol (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El precipitado final fue diluido en 50 µL de agua estéril y libre de ARNasas (Quiagen Sciences. Maryland, EUA).

La detección del VEN tanto en las tarjetas como en el fluido alantoideo control, se realizó mediante la amplificación de un segmento de 250 pares de bases localizado en el gen de la proteína de fusión (zona de corte), empleando para ello los iniciadores degenerados, 5'-CTGCCACTGCTACTTGIGATAATCC-3' y 5'-CCTTGGTGAITCTATCCGIAAGG-3' siguiendo el protocolo de RT-PCR descrito por Seal y col. [13]. Las muestras amplificadas fueron sometidas a electroforesis en un gel de 1,5% de agarosa y fueron visualizadas en una cámara de luz ultravioleta empleando bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/mL [4, 7, 8, 13].

Secuenciación y análisis de los nucleótidos del segmento amplificado

Los segmentos de ADN del tamaño esperado (250 pares de bases) fueron escindidos del gel y purificados empleando el

paquete comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron secuenciados empleando el paquete comercial de secuenciación BigDye Terminador v3,1 y el secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Las secuencias de nucleótidos y patrón de aminoácidos inferido del gen de la proteína de fusión del VEN, fueron analizadas con la ayuda del programa DNASTar (DNASTar, Inc., Madison, WI, EUA).

Inactivación del VEN en las tarjetas FTA[®]

Para demostrar la inactivación del virus en la tarjeta FTA[®], se intentó el re-aislamiento viral a partir de la matriz de la tarjeta impregnada con VEN. Brevemente, muestras de las tarjetas impregnadas con 50 μ L de fluido alantoideo con un título de $1 \times 10^{8.8}$ DL₅₀/mL del VEN, fueron colocadas en tubos estériles con 200 μ L del buffer de extracción (Whatman International, Ltd. Reino Unido) e incubadas a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente, 0,2 mL del sobrenadante de

las tarjetas y del fluido alantoideo positivo, fueron inoculados en huevos embrionados. Se realizaron tres pasajes sucesivos (cada 48 horas), el fluido alantoideo fue recolectado y analizado mediante RT-PCR determinar la presencia del virus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La combinación de tecnologías de punta, representadas por la utilización de las tarjetas FTA[®] [7-, 11, 15] y la prueba de RT-PCR acompañada de secuenciación de nucleótidos [4-6, 13], representan un aporte para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades que afectan la industria avícola ya que facilitan el diagnóstico y determinación de la patogenicidad de los virus de interés en la sanidad avícola. Los productos amplificados mediante RT-PCR para cada una de las diluciones de fluido alantoideo analizadas desde la tarjeta y del fluido alantoideo antes de su inactivación, se muestran en la FIG. 1. La sensibilidad de las tarjetas fue alta, se detectó el virus en el fluido alantoideo con un título inicial de $1 \times 10^{8.8}$

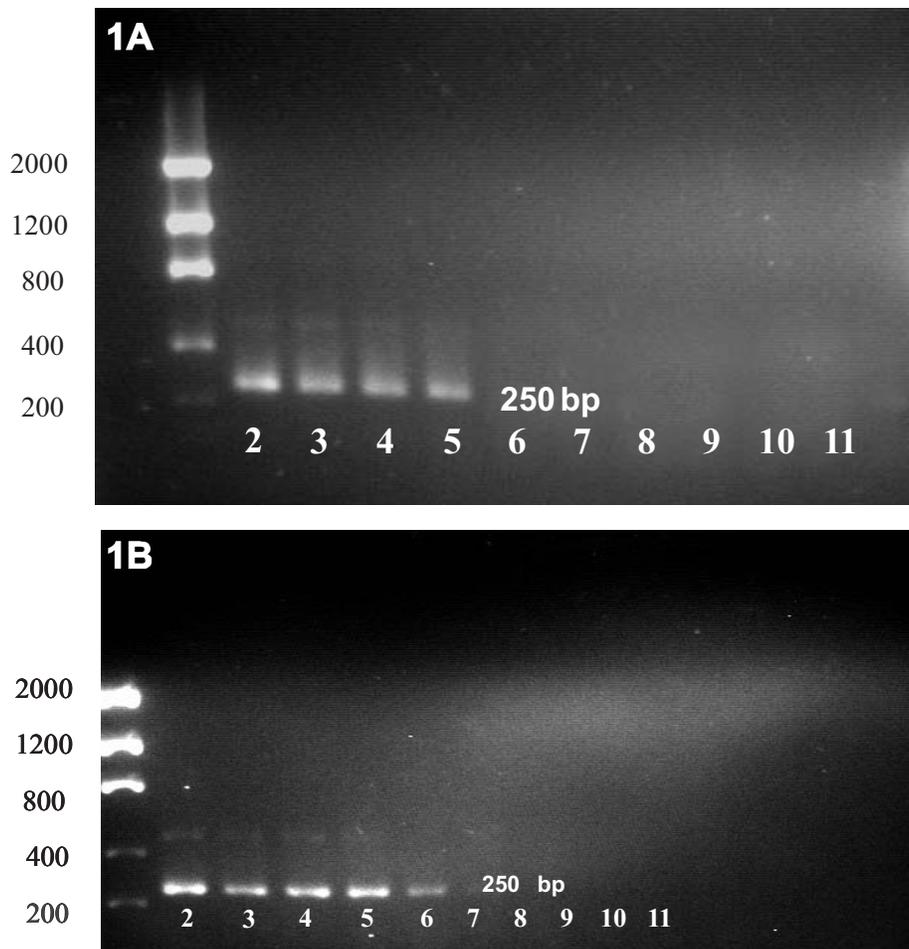


FIGURA 1. DETECCIÓN DEL VEN MEDIANTE RT-PCR. 1A= FLUIDO ALANTOIDEO INACTIVADO EN LAS TARJETAS FTA[®]. 1B= FLUIDO ALANTOIDEO NO INACTIVADO. COLUMNA 1= MARCADOR MOLECULAR (AMRESKO Inc. EUA). COLUMNAS 2 A 11= DILUCIONES SERIADAS DEI FLUIDO ALANTOIDEO CON UN TÍTULO INICIAL DE $10^{8.8}$ DL₅₀ (HASTA 10^{-9}) / RT-PCR DETECTION OF NDV. 1A=FTA INACTIVATED ALLANTOIC FLUID. 1B= NON-INACTIVATED ALLANTOIC FLUID. LINE 1= MOLECULAR MARKER (AMRESKO Inc. USA). LINES 2-11 = TEN FOLD DILUTIONS (UNTIL 10^{-9}) OF THE INITIAL ALLANTOIC FLUID WITH A TITER OF $10^{8.8}$.

DL₅₀/mL, incluso después de una dilución de 1/1000, siendo capaz de permitir la identificación del VEN en fluido alantoideo con una concentración de $1 \times 10^{5.8}$ LD₅₀. Esta sensibilidad es equivalente a la de pruebas clásicas de detección para el VEN, como la prueba de hemoaglutinación rápida en placa, la cual permite identificar la presencia del virus en fluido alantoideo con un título de 1×10^5 LD₅₀ [18]. La prueba de RT-PCR realizada al fluido alantoideo control, permitió detectar niveles de hasta $1 \times 10^{4.8}$ LD₅₀, lo que demuestra una diferencia en la sensibilidad debido a la muestra utilizada. La diferencia en sensibilidad entre las tarjetas y el fluido alantoideo previo a su inactivación, probablemente se deba al proceso de inactivación química que ocurre en la matriz de la tarjeta y ha sido reportado para otros microorganismos [9, 11, 12, 15].

En la FIG. 2 se observan los resultados de las pruebas de RT-PCR para las diluciones seriadas del fluido alantoideo realizadas los días 1, 7 y 14 después de la inactivación de las muestras en las tarjetas. La identificación del virus fue posible en cada uno de los días analizados, proporcionando un tiempo suficiente entre la toma de muestra y la realización de la prueba, incluso si esta es enviada entre laboratorios de dis-

tintos países. La disminución de un logaritmo en la capacidad de detección observada el día 14 (FIG. 2), ha sido explicada en la literatura como la consecuencia de la desnaturalización natural del ARN a lo largo del tiempo, debido a efectos medioambientales [7].

La secuenciación de los nucleótidos amplificados del gen de la proteína de fusión del VEN inactivado en las tarjetas, permitió predecir la secuencia de aminoácidos en la zona de corte de la proteína de fusión del virus (FIG. 3), donde se ubican los marcadores moleculares que permiten determinar su patogenicidad [10, 13]. En concordancia con la cepa del VEN aplicada a la tarjetas (cepa LaSota), el análisis de la secuencia de aminoácidos demostró la presencia de un virus lentogénico. El proceso de inactivación del VEN en las tarjetas FTA®, no afectó la secuencia de nucleótidos ni el patrón inferido de aminoácidos, respetando la integridad del ARN viral. Estos resultados concuerdan con lo reportado sobre la calidad de ácidos nucleicos que pueden recuperarse de la tarjetas FTA® luego de la inactivación de los microorganismos [7, 9, 11, 15].

Utilizando RT-PCR, no fue posible detectar partículas virales en el fluido alantoideo de embriones inoculados con una

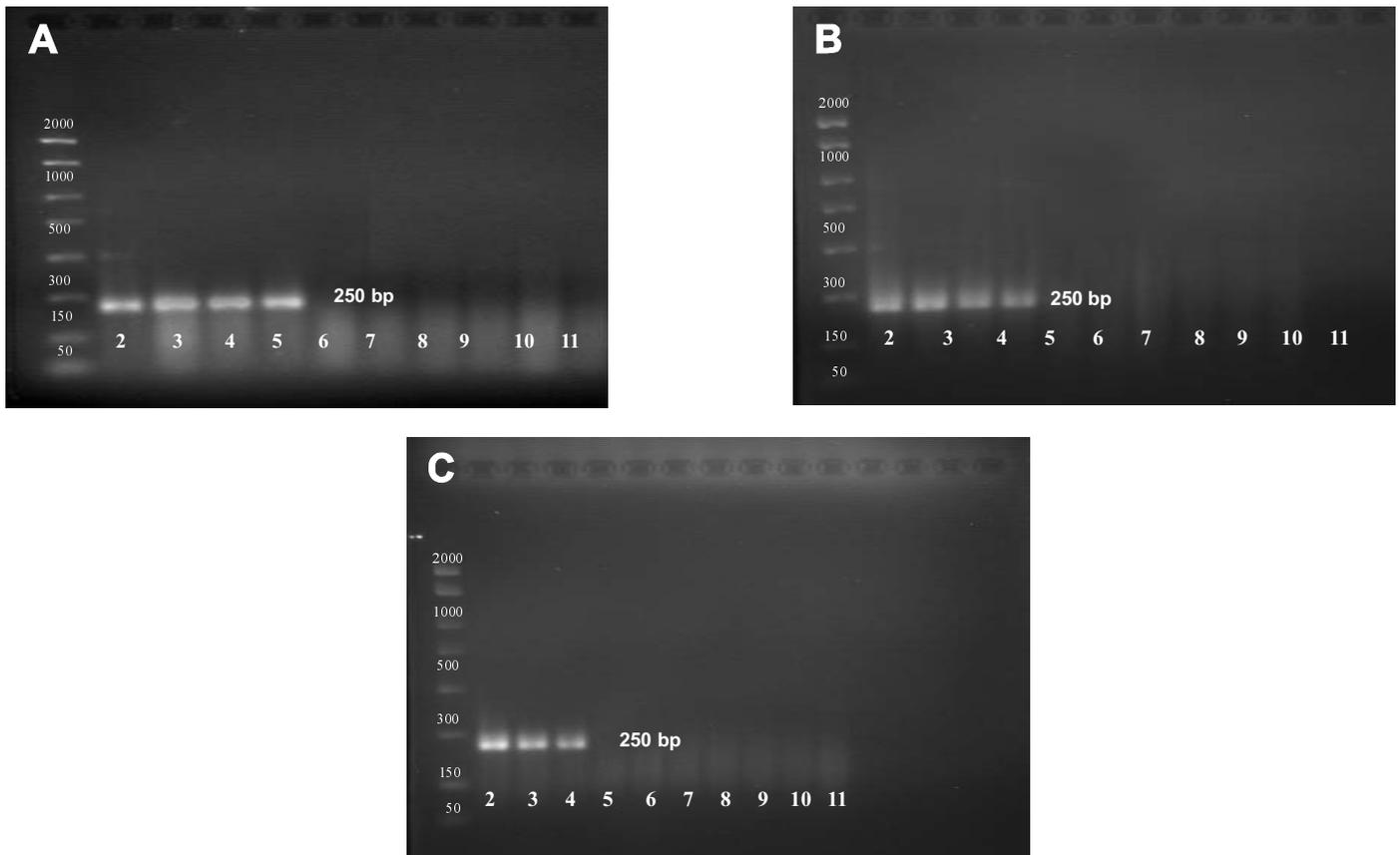


FIGURA 2. ESTABILIDAD LAS DE TARJETAS FTA® PARA LA DETECCIÓN DEL VEN. A, B, C= DÍAS 1, 7, 14 POST-MUESTREO RESPECTIVAMENTE. COLUMNA 1= MARCADOR MOLECULAR (AMRESCO Inc. EUA). COLUMNAS 2-11= DILUCIONES SERIADAS HASTA 10^{-9} DE FLUIDO ALANTOIDEO CON UN TÍTULO INICIAL DE $10^{8.8}$ / NDV DETECTION STABILITY OF FTA® CARDS. A, B, C = 1, 7 AND 14 DAYS POST SAMPLING RESPECTIVELY. LINE 1= MOLECULAR MARKER (AMRESCO Inc. USA). LINES 2-11 = TEN FOLD DILUTIONS (UNTIL 10^{-9}) OF THE INITIAL ALLANTOIC FLUID WITH A TITER OF $10^{8.8}$.

solución de virus inactivado en la tarjeta. Por su parte, las muestras provenientes de embriones inoculados con el fluido alantoideo no inactivado resultaron positivas a la identificación molecular (FIG. 4). Estos resultados coinciden con varios reportes sobre la completa inactivación de diferentes tipos de microorganismos al contacto las tarjetas FTA® [9, 12, 15].

La patotipificación biológica del virus permite establecer su virulencia, pero requiere de replicación activa en embriones y aves para ser llevada a cabo, con un costo muy alto en mano de obra y tiempo [1]. Por su parte, la patotipificación molecular que puede realizarse a partir de muestras inactivadas en las tarjetas FTA®, permite predecir con alto grado de confianza, la virulencia del virus [6, 13]. De allí la significancia de

3A

```
TCCTTGGTGAGTCTATCCGGAGGATACAAGAGTCTGTGACTACATCTGGAGGG
GGGAGACAGGGGCGCCTTATAGGCGCCATTATTGGCGGTGTGGCTCTTGGGG
TTGCAACTGCCGCACAATAACAGCGGCCGCAGCTCTGATACAAGCCAAACA
AAATGCTGCCAACATCCTCCGAC TTAAGAGAGCATTGCCGCAACCAATGAG
GCTGTGCATAGTCC.
```

3B

```
LGESIRRIQESVTTSGGGRQRLIGAIIGGVALGVATAAQITAAAALIQAKQNAANIL
RLKESIAATNEAVHS.
```

113 114 115 116 - 117
R Q G R - L Lentogénico
arg gln gly arg - leu

FIGURA 3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN DEL VEN. 3A= SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS CORRESPONDIENTES AL FRAGMENTO DE 250 PARES DE BASES AMPLIFICADO. 3B= SECUENCIA INFERIDA DE AMINOÁCIDOS / NDV FUSION PROTEIN GEN NUCLEOTIDE AND AMINO ACID SEQUENCE ANALYSIS. 3A= NUCLEOTIDE SEQUENCING OF THE 250 BASE PAIRS FROM THE AMPLIFIED FRAGMENT. 3B= PREDICTED AMINO ACID SEQUENCE.

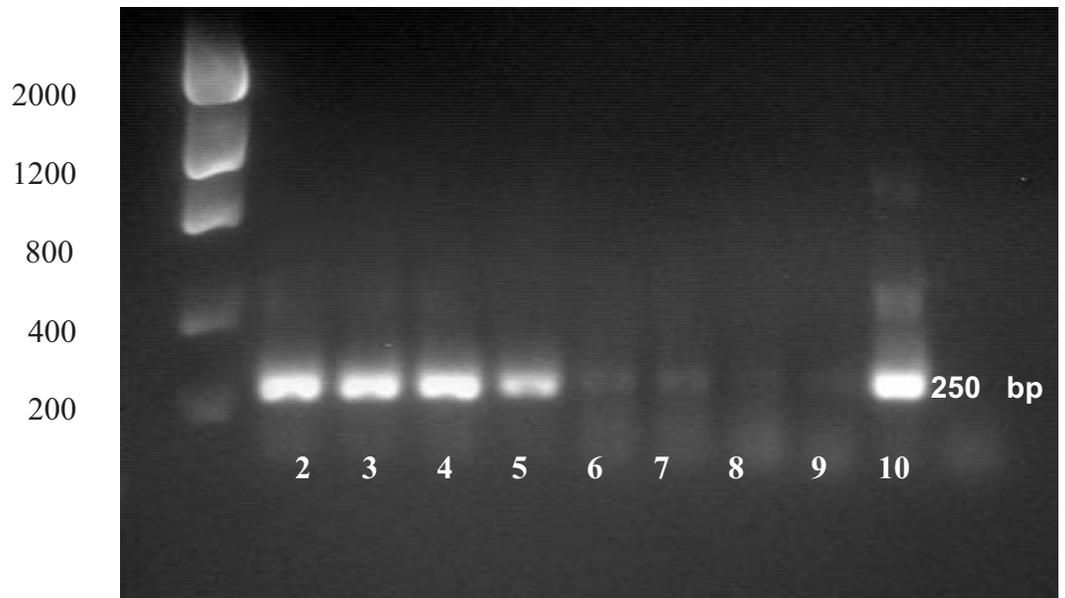


FIGURA 4. INACTIVACIÓN DEL VIRUS DEL VEN EN TARJETAS FTA®. COLUMNA 1= MARCADOR MOLECULAR (AMRESCO Inc. EUA). COLUMNAS 2-5= RT-PCR EN 4 EMBRIONES INOCULADOS CON VIRUS PREVIO A LA INACTIVACIÓN EN LAS TARJETAS FTA®. COLUMNAS 6-9= RT-PCR EN 4 EMBRIONES INOCULADOS CON VIRUS INACTIVADO EN TARJETAS FTA®. COLUMNA 10= CONTROL POSITIVO / NDV INACTIVATION BY FTA® CARDS. LINE 1= MOLECULAR MARKER (AMRESCO Inc. USA). LINES 2-5 = RT-PCR FOR FOUR EMBRYOS INOCULATED WITH NDV BEFORE FTA® INACTIVATION. LINES 6-9 RT-PCR FOR 4 EMBRYOS INOCULATED WITH FTA® INACTIVATED VIRUS. LINE 10 POSITIVE CONTROL.

contar con un mecanismo de muestreo, inactivación y transporte para el VEN que evite los riesgos biológicos que ocasiona el transporte del virus entre laboratorios [16] y las pruebas *in vivo* [1].

CONCLUSIONES

1. Las tarjetas FTA[®] permitieron la identificación mediante RT-PCR del virus de la enfermedad de Newcastle en fluido alantoideo, incluso 14 días después de tomada la muestra.

2. La secuenciación de los nucleótidos amplificados a partir del virus presente en las tarjetas FTA[®], permite predecir la secuencia de aminoácidos de la zona de corte de la proteína de fusión y la virulencia del aislamiento.

3. Las tarjetas FTA[®] inactivaron completamente el VEN, lo cual garantiza un muestreo y transporte seguro, proporcionando una fuente confiable de ácidos nucleicos para su identificación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALEXANDER, D. Gordon Memorial Lecture. Newcastle disease. **Br. Poult. Sci** 42(1): 5-22. 2001.
- [2] DE LEEUW, A.; PEETERS, B. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. **J Gen Virol** 80 (Pt 1): 131-136. 1999.
- [3] DOBBS, L.; MADIGAN, M. Use of FTA gene guard filter paper for the storage and transportation of tumor cells for molecular testing. **Arch Pathol Lab Med.** 126(1): 56-63. 2002.
- [4] FARSANG, A.; WEHMANN, E.; SOÓS, T.; LOMNICZI, B. Positive identification of Newcastle disease virus vaccine strains and detection of contamination in vaccine batches by restriction site analysis of the matrix protein gene. **J. Vet. Med. B.** 50(7): 311-315. 2003.
- [5] GOHMN, D.; THUR, B.; HOFMAN, M. Detection of Newcastle disease virus in organs and feces of experimentally infected chickens using RT-PCR. **Avian Pathol** 29: 143-152. 2000.
- [6] MARIN, M.; VILLEGAS, P.; BENNETT, J.; SEAL, B. Virus characterization and sequence of the fusion protein gene cleavage site of recent Newcastle disease virus field isolates from the southeastern United States and Puerto Rico. **Avian Dis.** 40(2): 382-390. 1996.
- [7] MOSCOSO, H.; RAYBON, O.; HOFACRE, C.; KLEVEN, S. Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA filter paper. **Avian Dis** 49(1): 24-29. 2005.
- [8] MOSCOSO, H.; THAYER, S.; HOFACRE, C.; KLEVEN, S. Inactivation, storage, and PCR detection of mycoplasma on FTA filter paper. **Avian Dis** 48(4): 841-850. 2004.
- [9] NATARAJAN, P.; TRINH, T. Paper-based archiving of mammalian and plant samples for RNA analysis. **Bio-tech** 29(6): 1328-1333. 2000.
- [10] PANDA, A.; HUANG, Z.; ELANKUMARAN, S.; ROCKEMMAN, D.; SAMAL, S. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. **Microb Pathog** 36(1): 1-10. 2004.
- [11] RAINA, A.; DOGRA, T. Application of DNA fingerprinting in medicolegal practice. **J Indian Med Assoc** 100(12): 688-694. 2002.
- [12] ROGERS, C.; BURGOYNE, L. "Reverse transcription of an RNA genome from databasing paper (FTA[®]). **Bio-technol Appl Biochem.** 31 (Pt 3): 219-224. 2000.
- [13] SEAL, B.; KING, D.; BENNETT, J. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. **J Clin Microbiol** 33(10): 2624-2630. 1995.
- [14] SHIHMANter, E.; PANSIN, A.; LIPKIND, M. Nucleotide sequence of the matrix protein gene of avian Paramyxovirus, serotype 3b: evidence on another member of the suggested new genus of the subfamily Paramyxovirinae. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 28(1): 37-51. 2005.
- [15] SMITH, L.; BURGOYNE, L. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. **BMC Ecol** 4(1): 4. 2004.
- [16] SNYDER, J. Packaging and shipping of infectious substances. **Clin. Microbiol. Newsl.** 24:89-93. 2002.
- [17] VILLEGAS, P. Viral diseases of the respiratory system. **Poult Sci** 77(8): 1143-1145. 1998.
- [18] VILLEGAS, P. Titration of biological suspensions. In: D.E. Swayne, J.R. Glisson, M. W. Jackwood, J.E. Pearson, and W.M. Reed, (Eds.), **Isolation and Identification of Avian Pathogens.** 4th Ed. The American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. 248-253. pp. 1998.