

ALTA SENSIBILIDAD DE RT-PCR ANIDADA PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME DEL TAURA EN CAMARONES PENEIDOS

(HIGH SENSITIVITY OF A NESTED-RT-PCR PROTOCOL FOR THE DETECTION OF TSV IN PENAEID SHRIMP)

HECTORINA RODULFO¹, MARCOS DE DONATO¹, MARIA EUGENIA RODRÍGUEZ¹, MÉLIDA BOADA²

¹ Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Instituto de Investigaciones de Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Laboratorio de Genética Modular.

² Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Laboratorio Patología de Organismos Acuáticos.
Email: marcosdedonato@yahoo.com

RESUMEN

El desarrollo y la sustentabilidad del cultivo de camarones en América han presentado epidemias virales que afectan significativamente su producción. Para solventar estos problemas, se ha propuesto la detección de infecciones usando protocolos de diagnóstico altamente sensibles, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante la presente investigación se diseñó un protocolo de PCR por transcripción reversa (RT-PCR) de doble ronda para la detección del virus del síndrome del Taura (TSV). La evaluación de este protocolo se realizó mediante el análisis de 400 muestras: a) 100 muestras de camarones cultivados *Litopenaeus vannamei* sintomáticos positivos para TSV; b) 100 muestras previamente analizadas mediante otras metodologías de PCR, también positivas para TSV; y c) 200 muestras procedentes de camarones certificados libre de patógenos específicos (controles negativos). Usando este protocolo se detectó el TSV en muestras de camarones infectados con baja carga viral, demostrando un nivel de sensibilidad más de 100 veces superior al nivel de los RT-PCR de ronda simple. La RT-PCR anidada mostró una sensibilidad y especificidad de 100%. La secuencia del fragmento de 294 pb de la primera amplificación fue 100% idéntica a la secuencia del TSV de la cepa venezolana. La secuencia del fragmento de 231 pb de la segunda amplificación también fue 100% idéntica a la secuencia del TSV venezolano. De acuerdo con los resultados, consideramos que la metodología propuesta resultaría útil para la implementación de medidas preventivas y de control para disminuir el impacto de esta enfermedad en la industria del cultivo de camarones.

PALABRAS CLAVE: Virus Taura, RT-PCR, Camarones.

ABSTRACT

The development and sustainability of the shrimp culture in the Americas have presented viral epidemics that have greatly affected their production. In order to overcome these problems, the detection of infections using highly sensible diagnostic protocol has been proposed, such as the polymerase chain reaction (PCR). Here, we have designed a PCR protocol by nested, Reverse Transcription PCR (RT-PCR) for the detection of the Taura syndrome virus (TSV). The evaluation of this protocol was carried out through the analysis of 400 samples: a) 100 tissue samples from cultivated *Litopenaeus vannamei* showing TSV symptoms; b) 100 samples of asymptomatic *L. vannamei* positive to TSV by other PCR protocols; and c) 200 shrimp samples, certified to be specific pathogen free (negative controls). Using this protocol we have detected TSV in infected shrimp samples when was present at a very low level, showing more than 100 fold increase in the detection level compared to single round RT-PCR. The nested RT-PCR showed a sensitivity and specificity of 100%. The sequence of the 294 bp fragment of the first round of amplification was 100% homologous to the TSV sequence of the Venezuelan strain. The sequence of the 231 bp fragment of the second round of amplification was also 100% homologous to the Venezuelan TSV sequence. According to these results, the proposed protocol will be very useful for the implementation of preventive and control measures to decrease the impact of this disease to the shrimp industry.

KEY WORDS: Taura Virus, RT-PCR, Shrimp.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades virales han constituido un difícil punto de control en la cría de camarones, ya que estos organismos carecen de un sistema inmunológico bien desarrollado, lo que ocasiona una falta de respuesta de

protección ante las prácticas de vacunación de las crías de camarones (Chamberlain 2002).

En Venezuela, apenas a finales del año 2004 se detectó el virus del síndrome del Taura (TSV) en las camaronerías del estado Zulia y de allí ocurrió una rápida diseminación

del virus hacia otras regiones del país. Como resultado, cerca del 90% de la producción total del país, que había alcanzado una cifra tope de 35.000 toneladas métricas en el año 2004, se vio afectada (Insopesca 2006).

En el 2005, la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) reportó una epidemia del TSV en Venezuela con 26 brotes identificados en granjas de los estados Zulia (14), Falcón (8), y en el estado Nueva Esparta, específicamente en la isla de Coche (4). Los camarones fueron diagnosticados como positivos para TSV usando la técnica de RT-PCR en el Laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona (OIE 2005). A consecuencia de esos brotes ocurrió una alta mortalidad, luego de que se manifestaran los signos clínicos de la enfermedad. Aunque no se conoció el origen de la infección, se propuso que su dispersión ocurrió a través de de las heces de aves, el canibalismo y el traslado de animales enfermos (Aguado *et al.* 2008).

Frente a este problema, el diagnóstico y manejo de camarones constituye un gran aporte para la sustentabilidad de la camaronicultura en momentos de crisis, por lo que constituye una prioridad el desarrollo de técnicas de detección y diagnóstico, específicas y sensibles, a fin de realizar una detección oportuna del virus, y conocer su distribución, evaluar la población de los reservorios y tomar las medidas preventivas correspondientes. En el caso del cultivo de camarones peneidos, los métodos de detección de la infección basada en sistemas inmunológicos y, especialmente, métodos moleculares (Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR) proveen más exactitud y son más estandarizables para el diagnóstico de enfermedades y la detección de patógenos, especialmente en el caso de ciertos virus (Lightner 1996, Lightner y Pantoja 2002). Por esto, se propone optimizar un método de diagnóstico de TSV altamente sensible que permita ofrecer servicios de diagnóstico de patógenos de camarones como apoyo al fortalecimiento de la industria camaronera en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la evaluación del método de diagnóstico del TSV se procedió a analizar 100 muestras de camarones *Litopenaeus vannamei* cultivados en granjas camaroneras del estado Zulia con síntomas característicos la infección viral, como enrojecimiento de urópodos y telson, presencia de focos necrosados en el exoesqueleto y flacidez muscular. Todas estas muestras habían sido previamente diagnosticadas como positivas mediante ensayos de RT-PCR, utilizando los oligonucleótidos desarrollados por la compañía Diagxotics (Lawrenceville, NJ, USA), así como también aquellos desarrollados por Nunan *et al.* (1998). Se

evaluaron también 100 camarones *L. vannamei* cultivados en las mismas granjas, positivos también al TSV por RT-PCR pero que no presentaban síntomas clínicos. Por último, se utilizaron muestras de 200 camarones cultivados de *L. vannamei* certificados como libres de patógenos específicos (SPF) procedentes de la compañía Shrimp Improvement Systems (SIS, Isla Morada, Florida, USA) y que resultaron previamente negativos por ambos tipos de RT-PCR. Todos los camarones positivos al TSV tuvieron un rango de peso que varió entre 6 y 10 g, mientras que los camarones SPF tuvieron un rango de peso entre 21 y 33 g en machos y 26 y 38 g en hembras.

Los camarones recolectados fueron colocados inmediatamente en hielo y transportados al laboratorio de Genética Molecular, del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Suzan Tai" de la Universidad de Oriente (IIBCAUDO), donde fueron congelados a -70°C para su posterior análisis. Del primer grupo de muestras de camarones sintomáticos, positivos por RT-PCR, se obtuvieron 4 tipos de muestras: muestras de hemolinfa, tomadas con inyectora hipodérmica de 1 cm³ y aguja de 23 G, muestras de tejido de la región hepatopancreática del cefalotórax (lisado de hepatoáncreas, órgano linfoide, hemolinfa), tejidos de pleópodos y tejido muscular de las lesiones necróticas. A los camarones asintomáticos y los SPF sólo se les tomó muestras de hemolinfa. Todas las muestras de hemolinfa fueron fijadas en etanol al 95%.

Una vez en el laboratorio, se tomaron muestras de tejido (50 mg) o de hemolinfa (aproximadamente 100 µL) de cada organismo y éstas fueron colocadas individualmente en tubos eppendorf para realizar el procedimiento de extracción de ARN utilizando el sistema de aislamiento de ARN total RNAgents® (Promega, Corp., Madison, WI, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. El ARN total obtenido fue congelado a -20°C hasta su uso.

El diagnóstico molecular se llevó a cabo implementando la técnica de RT-PCR por tres técnicas distintas. La primera se realizó utilizando el kit de diagnóstico ShrimPCaRe® Simplex (Diagxotics, Lawrenceville, NJ, USA) con iniciadores que amplifican un fragmento no especificado de 231 pares de bases (pb). La segunda técnica se realizó por amplificación de un fragmento también de 231 pb utilizando los iniciadores elaborados por Nunan *et al.* (1998) TSVF: TCAATGAGAGCTTGGTCC y TSVR: AAGTAGACAGCCGCGCTT. La tercera técnica consistió en una doble amplificación, primero de un fragmento con el par de iniciadores TSV1F (CCAAAAACACGTGTGAGGAG) y TSV1R

(AAAACGTCGCGAGAGAGAGA), diseñados por el Laboratorio de Genética Molecular del IIBCAUDO, a partir de la secuencia del TSV en el GenBank (Número de acceso AF277675), que amplifican un fragmento de 294 pb de la región intergénica y la secuencia que codifica para la proteína precursora de la cápside (Mari *et al.* 2002) (Figura 1). Posteriormente, y a partir de los fragmentos amplificados en la RT-PCR, se realizó una segunda amplificación por PCR utilizando los iniciadores de Nunan *et al.* (1998). Esta doble amplificación o RT-PCR

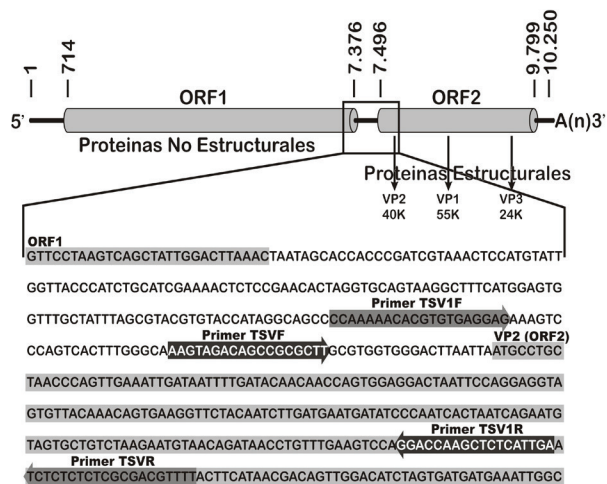


Figura 1. Secuencia del virus del síndrome del Taura (TSV) con los genes ORF1 y ORF2 (regiones en gris) en la que se muestra la secuencia de la región utilizada para diseñar los oligonucleótidos que amplifican los fragmentos de 294 pb (flecha gris clara) y 231 pb (flecha gris oscura).

anidada se hizo con el fin de aumentar significativamente la sensibilidad del diagnóstico para la detección del TSV.

En todas las amplificaciones por RT-PCR se utilizó el sistema Access RT-PCR (Promega, Corp., Madison, WI, USA), que permite realizar la reacción de transcripción reversa y la PCR en un solo tubo y se siguió el mismo protocolo de amplificación, utilizando el mismo volumen final de 25 μ L y la misma programación del termociclador: Un ciclo a 48 $^{\circ}$ C por 45 min, un ciclo a 94 $^{\circ}$ C por 2 min, 40 ciclos con un paso de 94 $^{\circ}$ C por 30 s, 55 $^{\circ}$ C por 45 s, 68 $^{\circ}$ C por 2 min, un ciclo a 68 $^{\circ}$ C por 7 min. La segunda amplificación de la RT-PCR anidada se realizó de la misma manera pero sin el primer paso de 48 $^{\circ}$ C por 45 min. Los amplificados obtenidos en todas las técnicas fueron corridos en gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio a 0,5 μ g/mL en buffer TBE 1X durante 45 min a 100 volts.

Los fragmentos de 294 y 231 pb amplificados a partir de un control positivo al TSV, fueron enviados al Centro de

Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) para la secuenciación con ambos iniciadores.

Para la determinación de los niveles de detección de las técnicas de RT-PCR simple y doble o anidada, se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} de una muestra utilizada como control positivo de TSV, obtenida del Laboratorio de Patología en Acuicultura, Departamento de Ciencia Veterinaria y Microbiología, Universidad de Arizona, USA. Para evaluar la RT-PCR doble como técnica de diagnóstico, se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y se usó el coeficiente de kappa para medir la coincidencia entre esta técnica y las técnicas de RT-PCR simple aplicadas (Franz y Conraths 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para esta investigación se extrajeron un total 700 muestras de ARN a razón de: 400 muestras de los 100 camarones sintomáticos previamente diagnosticados (100 muestras de hemolinfa, 100 de cefalotórax, 100 de pleópodos y 100 de tejido necrosado), 100 muestras de hemolinfa de los camarones asintomáticos y 200 muestras de camarones SPF. En todas las extracciones se obtuvo ARN de buena calidad y cantidad, ya que no estaba degradado (según el resultado de la electroforesis) y la relación de la densidad óptica a 260/280 varió entre 1,8 y 2,0.

Las secuencias obtenidas del CeSAAN a partir de los fragmentos de 294 y 231 pb, mostraron 99% de coincidencia con la secuencia del TSV en el GenBank (Número de acceso AF277675).

Tabla 1. Total de muestras positivas, analizadas mediante las diferentes técnicas de diagnóstico molecular utilizadas en este estudio, sobre diferentes tipos de muestras de camarones con sintomatología característica del TSV.

Tipo de Tejido	N	RT-PCR 1	RT-PCR 2	RT-PCR 3	RT-PCR Anidada
Hemolinfa	100	100	100	100	100
Cefalotórax	100	100	100	100	100
Pleópodos	100	98	98	98	100
Tejido Necrosado	100	100	100	100	100

RT-PCR 1: Oligos de Diagxotics, RT-PCR 2: Oligos de Nunan *et al.* (1998), RT-PCR 3: Oligos desarrollados por el Lab. Genética Molecular del IIBCAUDO Dra. Suzan Tai.

La comparación del diagnóstico de los 3 tipos de RT-PCR simple utilizados en este estudio para el diagnóstico del TSV, así como del resultado de la RT-PCR anidada para los distintos tipos de tejidos mostró resultados idénticos para todas las técnicas (Tabla 1), pero cuando se comparó el tipo de tejido a utilizar para el diagnóstico se observaron dos muestras de pleópodos de camarones que resultaron negativas por los tres tipos de RT-PCR simple, pero positivas por la RT-PCR anidada. En este sentido, Tang *et al.* (2004), quienes cuantificaron la carga viral de diferentes tejidos de camarones *L. vannamei* infectados con TSV, reportaron que las muestras de pleópodos y branquias contenían 100 veces menor carga viral y, por ende, un menor nivel de detección, comparado con el órgano linfoide. Esto concuerda con un mayor nivel de detección esperado para la RT-PCR anidada obtenida en la presente investigación. Es muy probable que el nivel de infección viral en estas dos muestras de pleópodos haya sido muy bajo para ser detectado por una sola ronda de amplificación.

Tabla 2. Resultados del diagnóstico por RT-PCR anidada en camarones *L. vannamei* sintomáticos, asintomáticos y SPF, tomando como estándar de oro el diagnóstico conjunto de los oligos de Diagxotics y Nunan *et al.* (1998).

Tipo de Tejido	N	Estándar de Oro		RT-PCR Anidada	
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Camarones sintomáticos TSV +	100	100	0	100	0
Camarones asintomáticos TSV +	100	100	0	100	0
Camarones SPF TSV -	200	0	200	0	200

Tabla 3. Validación de la técnica de diagnóstico del TSV por RT-PCR anidada y el valor de Kappa como medida de la coincidencia del diagnóstico, comparado con el estándar de oro del diagnóstico conjunto de los oligos de Diagxotics y Nunan *et al.* (1998).

Tipo de Tejido	%
Sensibilidad	100
Especificidad	100
Valor Predictivo Positivo	100
Valor Predictivo Negativo	100

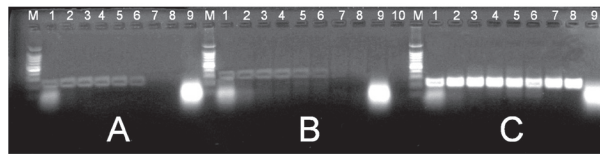


Figura 2. Detección molecular de TSV por RT-PCR anidada. Primera ronda usando primers para un fragmento pequeño (A) y grande (B) y la segunda ronda (C) del RT-PCR. Los fragmentos específicos de TSV de 231 (A) y 294 (B) pares de bases en tamaño. M: marcador de peso molecular de 100 bp, pozos 1-8: muestras positivas de camarones al TSV sin dilución y con diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Pozo 9: Control negativo (agua). Pozo 10: Vacío.

Por otra parte, la comparación de la RT-PCR anidada con el resultado combinado de las RT-PCR de Diagxotics y Nunan *et al.* (1998) utilizadas como estándar de oro, demostró 100% de coincidencia, siendo 100% sensible y específica, según las muestras tomadas como verdaderos positivos y negativos (Tablas 2 y 3). Además, cuando se realizó el diagnóstico por las RT-PCR simples y la anidada, utilizando las diluciones seriadas del control positivo, se observó amplificación de las RT-PCR simples hasta una dilución de 10^{-5} , mientras que para la RT-PCR anidada se observó amplificación de una banda intensa hasta en la última dilución de 10^{-7} (Figura 2). Esto coincide con lo reportado para la técnica de RT-PCR simple de Nunan *et al.* (1998) y la RT-PCR anidada del estuche comercial IQ2000TM TSV Detection and Prevention System (GeneReach Biotechnology Corp., Taiwan), donde la RT-PCR anidada demostró un nivel de detección 100 veces mayor que la RT-PCR simple (Kiatpathomchai *et al.* 2007). También ha sido reportado un nivel de detección de 100 a 1000 veces mayor para el diagnóstico del virus de la cabeza amarilla (YHV) por RT-PCR anidada en *Penaeus monodon* de Australia y Tailandia comparada con la RT-PCR simple (Cowley *et al.* 2004).

Similarmente, la detección por PCR anidada tuvo un nivel de detección 150 a 1000 veces mayor que la multiplex RT-PCR/PCR (Khawsak *et al.* 2008) para el diagnóstico de los virus de camarones de ARN de la cabeza amarilla (YHV), TSV y los virus de ADN del síndrome de la mancha blanca (WSSV) de la hepatopancreatitis (HPV), de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) y el baculovirus del monodon (MBV). Resultados similares han sido registrados al comparar la detección por PCR anidada o PCR simple en MBV infectando a larvas de *P. monodon* (Belcher y Young 1998).

La principal aplicación de las herramientas moleculares en acuicultura es en el área de diagnóstico y tratamiento de enfermedades que atacan a los especímenes de cultivo. Esta área es vital en la industria porque la aparición de brotes de enfermedades produce enormes pérdidas que merman la producción. Entre las técnicas moleculares más aplicadas en la acuicultura se encuentran la PCR, dot blot e hibridación *in situ*, las cuales se diferencian de otras técnicas de diagnóstico de patógenos en la sensibilidad y el tiempo para emitir resultados. Está comprobado que la aplicación de la PCR para el diagnóstico de patógenos garantiza una mayor sensibilidad en la detección, porque se identifican cantidades más pequeñas de partículas infecciosas por unidad de análisis, en comparación con las otras técnicas de mencionadas. La aplicación del diagnóstico de patógenos de manera oportuna ha

disminuido drásticamente las pérdidas por mortalidades y ha aumentado la producción de organismos de cultivo (Lightner 1996, Lightner y Pantoja 2002).

El camarón es particularmente susceptible a patógenos virales. La persistencia de estas infecciones se caracteriza porque frecuentemente no producen signos de enfermedad o mortalidad, lo que las hace pasar inadvertidas y pueden ser desconocidas y/o difíciles de detectar, causando enormes pérdidas entre las poblaciones cultivadas y silvestres, así como un severo impacto socio-económico entre los habitantes de los países involucrados (Lightner 1996).

En este sentido, el sistema de diagnóstico aquí desarrollado de RT-PCR anidada ha demostrado tener un alto poder de detección del TSV, con un nivel de detección por lo menos 100 veces mayor al ya sensible método de RT-PCR de ronda simple. Este puede ser indispensable para mejorar un sistema de vigilancia del TSV en las poblaciones de camarones de cultivo y silvestres garantizando así el futuro de la industria de cultivo del camarón en el país.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente a través del proyecto número CI-2-0404-1369/07.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUADO N., BOADA M., DE DONATO M. 2008. Detección del síndrome del virus del Taura (TSV) en *Litopenaeus vannamei* (Boone) del occidente de Venezuela. Rev. Cient. FCV-LUZ 18(2):134-141.
- BELCHER C.R., YOUNG P.R. 1998. Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. J. Virol. Methods 74(1):21-29.
- CHAMBERLAIN G. 2002. Cultivo Sostenible de Camarón: mitos y realidades. INFOFISH Internacional. 03 de marzo del 2004. www.infopesca.org/articulos/art06.pdf
- COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A., BOONSAENG V., WALKER P.J. 2004. Multiplex RT-nested PCR differentiation of gill-associated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of *Penaeus monodon*. J. Virol. Methods 117(1):49-59.
- FRANZ J., CONRATHS G. 2006. Validation of molecular diagnostic techniques in the parasitological laboratory. Vet. Parasitol. 136: 91-98.
- KHAWSAK P., DEESUKON W., CHAIVISUTHANGKURA P., SUKHUMSIRICHART W. 2008. Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of six viruses of penaeid shrimp. Mol. Cel. Probes 22:177-183.
- KIATPATHOMCHAI W., JAREONRAM W., JITRAPAKDEE S., FLEGEL T.W. 2007. Rapid and sensitive detection of Taura syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. J. Virol. Methods 146:125-128.
- LIGHTNER D. (Ed.). 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. 345 pp.
- LIGHTNER D., PANTOJA C. 2002. Bioseguridad en el Cultivo de Camarones: métodos para mejorar la camaronicultura en Centroamérica. Departamento de Ciencias Veterinarias y Microbiología. Universidad de Arizona, USA. 123-166.
- MARI J., POULOS B.T., LIGHTNER D.V., BONAMI J.R. 2002. Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses J. Gen. Virol. 83 (4):915-926.
- NUNAN L., POULOS B., LIGHTNER D. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected shrimp. Dis. Aquat. Org. 34:87-91.
- OIE. 2005. Disease Information Report. 11 de marzo del 2005. Vol.18 (10). 13 de mayo del 2005. http://www.oie.int/esp/info/hebdo/EIS_02.HTM#Sec1
- TANG K.F.J., WANG J., LIGHTNER D.V. 2004. Quantitation of Taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. J. Virol. Methods 115(1):109-114.