

Desarrollo y Análisis del Sistema Conjunto PCR/Dot Blot para la Detección del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa

Jonathan Castro Lara ⁽¹⁾

Javier Robalino Iturralde⁽¹⁾

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar ⁽¹⁾

Escuela Superior Politécnica del Litoral ⁽¹⁾

Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral, Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador ⁽¹⁾

jocastro@espol.edu.ec

Resumen

*El presente trabajo se destinó al desarrollo y análisis del sistema conjunto PCR/dot blot para la detección del IHNV. La estrategia experimental se ejecutó en tres fases: 1) clonaje de región específica del genoma viral para la generación de sondas nucleicas contra IHNV, 2) optimización del protocolo de PCR/dot blot para la detección viral, y 3) evaluación del método optimizado de diagnóstico PCR/dot blot en la determinación de IHNV en muestras de *Penaeus vannamei*. Las pruebas de sensibilidad realizadas en fragmentos de ADN viral purificado mostraron valores de detección del dot blot (sin PCR) de hasta $3^{ps}/\mu$. El uso del conjunto PCR/dot blot permitió la detección de hasta $0.002^{as}/\mu$ de ADN, comparado con una sensibilidad de $2^{as}/\mu$ de la PCR sin dot blot. Este incremento en sensibilidad fue evidenciado durante la aplicación del protocolo PCR/dot blot al análisis de muestras de *P. vannamei*. En una población de reproductores analizada mediante PCR y PCR/dot blot, se encontraron resultados positivos para el virus en un 69.83% y 79.9%, respectivamente; mientras que en una población de juveniles los positivos estimados por ambas técnicas fueron 7.48% para PCR y 13.3% para PCR/dot blot. Así, el uso conjunto de PCR y dot blot, como técnica de detección viral, ofrece mayor sensibilidad y especificidad con respecto al diagnóstico basado solamente en PCR.*

Palabras claves: IHNV, dot blot, PCR, sondas nucleicas.

Abstract

*The present work describes development and analysis of a PCR/dot blot system for the detection of IHNV. The experimental strategy was performed in three phases: 1) cloning of specific regions of the viral genome for generation of oligonucleotide probes to recognize a region of the IHNV genome, 2) optimization of the PCR/dot blot protocol as a diagnostic tool, and 3) to test the method for diagnostic of IHNV in *Penaeus vannamei*. The analysis of sensibility performed in fragments of purified viral DNA showed levels of dot blot detection (without PCR) of $3^{ps}/\mu$. The use of PCR/dot blot system increased the sensibility of detection to $0.002^{as}/\mu$ of target DNA, in comparison; the sensibility of PCR without dot blot was $2^{as}/\mu$. This increase in sensibility was evident in the laboratory test of *P. vannamei* samples. Broodstock population was analyzed using PCR and PCR/dot blot, these analyses showed positive signals for IHNV in 69.83% and 79.9%, respectively. In a similar fashion, a population of juvenile shrimps showed positive signals for IHNV in 7.48% using PCR and 13.3% using PCR/dot blot. These results support the use of PCR/dot blot system as an alternative method for the sensitive and specific detection of viral genome, as compared to the traditional PCR method.*

1. Introducción

Uno de los primeros virus de camarón identificados en la década de los 1980's, fue el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHNV) [1] [2]. El IHNV causó alta mortalidad, mayor al 90%, en *Penaeus stylirostris* cultivados en Hawái, convirtiéndose en una de las principales causas de enfermedades conocidas en el cultivo de camarones penaeidos [3]. En otras especies comerciales, sobre

todo *P. vannamei* y *P. monodon*, el IHNV ha sido asociado con el síndrome conocido como RDS, caracterizado por un crecimiento lento y acumulación de deformidades [4] [5] [6].

El IHNV tiene una disposición icosaédrica sin envoltura, con un tamaño de 22nm de diámetro, que contiene un ADN lineal monocatenario de 4.1kb [7]. Basándose en las características de morfología y genética, el virus se clasifica dentro de la familia *Parvoviridae* [8] [9], y se encuentra estrechamente

relacionado con los densovirus pertenecientes al género *Brevidensovirus* [10].

El IHNV se encuentra distribuido en todo el continente Americano (desde Perú hasta México), Oceanía y Asia (Filipinas, Japón, Tailandia, Singapur, Indonesia, Oriente medio, Polinesia Francesa, Nueva Caledonia y Guam) [11] [12].

La infección con IHNV es fatal para *P. stylirostris* [4]; sin embargo, la tasa de mortalidad es baja en *P. vannamei* y *P. monodon*. En estas dos especies el virus es asociado con el síndrome del enanismo y rostro deformado (RDS), que se caracteriza por anomalías en el crecimiento y deformidades cuticulares [5] [6]. En ocasiones, juveniles de *P. monodon* no muestran signo alguno del RDS, a pesar de la presencia del virus [13], lo cual ha sido también observado en *P. vannamei* (Biogemar S.A., trabajos no publicados).

La PCR permite obtener o amplificar una secuencia de ADN en particular en un número muy elevado de copias [14]. El número de copias se incrementa exponencialmente según la cantidad de veces que se repita el ciclo de amplificación. En esta reacción se utiliza una enzima denominada ADN polimerasa termoestable, siendo la más utilizada la Taq polimerasa, que debe su nombre a la bacteria termófila de la cual procede (*Thermus aquaticus*) descubierta en Yellowstone, USA [15].

Dot blot es una técnica de alta sensibilidad y especificidad. Se utiliza en la detección de una región de ADN de interés, para lo cual se deposita directamente el ADN sobre la membrana de nylon y se desnatura ya sea de forma química (NaOH) o física (temperatura). Luego, se utiliza una sonda de ácidos nucleicos, que generalmente se marca con digoxigenina, biotina u otra molécula posteriormente detectable. La sonda marcada se hibrida por complementariedad al ADN fijado en la membrana. A su vez, la digoxigenina o molécula marcadora es reconocida por un anticuerpo conjugado a una enzima (ej. fosfatasa alcalina) u otra molécula detectora, que depende del tipo de molécula marcadora que se haya utilizado. Típicamente se produce una reacción colorimétrica ante la adición de un sustrato específico para la enzima conjugada a la molécula detectora, revelando la existencia del segmento de ADN de interés en la muestra [16].

2. Materiales y métodos

2.1 Preparación de la sonda nucleica

Mediante PCR se amplificó una región del genoma del virus (número de acceso en el GenBank AF218266), para a partir de ésta (región A), generar la sonda que se utilizó en el ensayo de dot blot. Se utilizó los iniciadores 5'-aattcgacgctgccaatgat-3' y 5'-gccaatgttacgtcgctt c-3', obteniendo un producto de 345pb. La mezcla de reactivos se realizó como sigue:

iniciadores (0.5µM de cada uno), dNTPs (0.2mM), Taq (Invitrogen) polimerasa (2.5U/50µl), MgCl₂ (1.5mM), en 1x búfer PCR (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl). Un volumen de 1µl de ADN molde fue utilizado por cada 20µl de volumen de reacción. La mezcla de reactivos fue desnaturada a 95°C por 3 minutos en un termociclador. Luego se realizó 41 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturación a 95°C por 30 segundos; hibridación a 58°C por 30 segundos; y polimerización a 72°C por 1 minuto. Al finalizar el último ciclo, las muestras fueron polimerizadas a 72°C por 3 minutos y luego almacenadas a 4°C. El producto obtenido se migró en un gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio.

Las bandas visualizadas fueron extraídas del gel utilizando el kit QI Aquick Gel Extraction (QIAGEN); el ADN obtenido fue clonado usando el kit TOPO TA Cloning, (Invitrogen), y secuenciado por MacroGen Inc. (Corea del Sur).

2.2 Marcaje de la sonda mediante PCR

La sonda de ADN fue marcada con Digoxigenin-11-dUTP (Roche) mediante PCR. Se utilizaron los mismos iniciadores que se usaron para generar la región A. La reacción de PCR se produjo bajo los siguientes parámetros: iniciadores (0.5µM de cada uno), dNTPs (0.2mM de dCTP, dGTP y dATP; 0.130mM de dTTP y 0.07mM de UTP-11-DIG), Taq (Invitrogen) polimerasa (2.5U/50µl), MgCl₂ (1.5mM), en 1x búfer PCR (20mM Tris-HCl, 50mM KCl). El ADN (plásmido conteniendo la región A secuenciada anteriormente) utilizado en la PCR fue previamente diluido a razón 1:300. De la dilución, un volumen de 1µl fue utilizado por cada 20µl de volumen de reacción de PCR. La mezcla de reactivos fue desnaturada a 95°C por 3 minutos en un termociclador. Luego se realizó 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturación a 95°C por 30 segundos; hibridación a 58°C por 30 segundos; y polimerización a 72°C por 1 minuto. Al finalizar el último ciclo, las muestras fueron polimerizadas a 72°C por 3 minutos y luego almacenadas a 4°C.

El producto amplificado marcado con digoxigenina (sonda) fue resuelto en agarosa al 1.2% y purificado utilizando el kit QI-Aquick PCR purification (QIAGEN), antes de ser utilizado en pruebas de hibridación.

2.3 Protocolo básico de dot blot

2.3.1 Pre-hibridación. La membrana de nylon se cortó al tamaño necesario, y se colocó sobre papel aluminio. Entre 0.5 y 1µl de cada muestra a analizar es depositado en la membrana. Esta membrana se deja secar durante 3 horas. La membrana es humedecida en solución 2x SSC (0.75M NaCl, 75mM Citrato de Sodio Na₃C₆H₅O₇). La muestra es desnaturada al

sumergir la membrana en solución 1 (0.5M NaCl, 0.2N NaOH) durante 5 minutos. Luego, se sumerge en solución 2 (1M NaCl, 0.5M Tris-Cl pH 8.0) durante 10 minutos, para neutralizarla. Finalmente, la membrana se coloca en un recipiente hermético con solución de hibridación Church-Gilbert (0.34M Na₂HPO₄, 0.16M NaH₂PO₄*H₂O, SDS 7.5%, 1mM EDTA, pH 7.2) durante 60 minutos a 65°C.

2.3.2 Hibridación. La sonda nucleica es llevada a 95°C por 5 minutos, para la desnaturalización de la doble cadena. Se renueva la solución de hibridación y se adiciona a la membrana la sonda previamente calentada. La membrana se deja hibridar a 65°C durante toda la noche (entre 16 y 24 horas).

2.3.3 Post-hibridación. La membrana es sumergida en solución 2x SSC por 10 minutos. Luego se realiza 3 lavados de 20 minutos cada uno, con solución de lavado 1 (0.2x SSC, SDS 0.1%) a 65°C, seguido de 3 lavados de 20 minutos cada uno, con solución de lavado 2 (0.1x SSC, SDS 0.1%) a 65°C. Por último, la membrana es lavada con solución 0.1x SSC por 5 minutos.

El proceso de revelado incluye la humectación de las membranas con TBS (12mM Tris-Cl pH 7.5, KCl 0.02%, NaCl 0.8%). Enseguida, la membrana es bloqueada al sumergirla en solución de leche descremada al 5% (diluida en TBS) durante 30 minutos. Se debe enjuagar la membrana con TBS, para luego añadir solución fresca de leche 5% (v/v) incorporando el anticuerpo (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments 0.75 U/μl, Roche) a razón de 1:15000, para dejar incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Luego se lava 5 veces con solución TBS, y se enjuaga 2 veces con búfer B (50mM Tris-Cl pH 9.0, 1mM MgCl₂, 0.1M NaCl). En este punto se añade el sustrato o solución de revelado (BM Purple AP Substrate precipitating, Roche) hasta observar reacción en los controles positivos en la membrana. Finalmente se realiza un lavado con búfer B para eliminar el sustrato de la membrana.

2.4 Bioensayos y animales experimentales

2.4.1 Ensayo con reproductores de *P. vannamei*. Para este ensayo, se utilizó 50 camarones (*P. vannamei*), provenientes de la maduración del laboratorio BIOGEMAR S.A. (Ayangue). Éstos se colocaron por separado en recipientes de 20 litros con agua de mar (34ppt), aireación constante y un flujo de agua de 8 horas durante el día. La alimentación se la realizó 2 veces al día con alimento balanceado comercial con un 35% de proteína. La muestra tomada era proveniente de uno de los pleópodos del cuarto o quinto segmento del animal y almacenadas en cuatro partes de etanol 95% por cada parte de muestra.

2.4.2 Ensayo con juveniles de *P. vannamei*. Se utilizó 200 juveniles de *P. vannamei* con un peso promedio de 1 a 1.6g, provenientes de una línea de reproductores con baja prevalencia del virus, perteneciente al laboratorio BIOGEMAR S.A. (Ayangue). Estos animales fueron colocados individualmente en recipientes de 250ml de capacidad, con agua de mar (34ppt) previamente tratada (200ppm de hipoclorito de sodio y 140 ppm de tiosulfato de sodio). Una vez por día se realizaba un recambio total de agua. Los camarones fueron muestreados tomando un pleópodo del cuarto o quinto segmento del animal, y almacenadas en 4 partes de etanol 95% por cada parte de muestra.

3. Resultados

3.1 Sondas nucleicas para la detección de IHHNV

La región A fue escogida como blanco de detección debido a la existencia de protocolos bien establecidos y validados para el diagnóstico de IHHNV en base a la amplificación de dicha región utilizando PCR (BIOGEMAR S.A., datos no publicados). La amplificación del fragmento A, a ser utilizado para el marcaje de sondas con los iniciadores 5'-aattcgacgctccaatgat-3' (IHHNV-5) y 5'-gccaatgttacgtcggettcc-3' (IHHNV-6), produjo el producto esperado de aproximadamente 345pb. El clonaje en la bacteria *E. coli* por medio del vector pCR®4-TOPO® fue exitoso, resultando en múltiples clones recombinantes, de los cuales se caracterizaron dos clones. A partir de estos, se realizaron 3 preparaciones de ADN plasmídico, dos de ellas provenientes del mismo clon y una tercera a partir de un clon diferente.

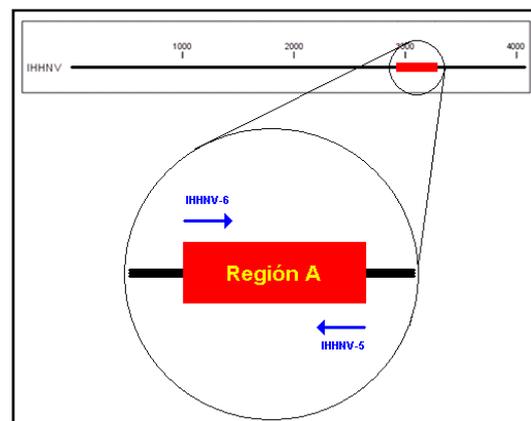


Figura # 1. Región A, seleccionada para desarrollar la sonda nucleica.

Los resultados de la secuenciación de las 3 preparaciones de ADN para la región A, se usaron para generar una secuencia consenso, que luego fue alineada con la secuencia del IHHNV (número de acceso en el GenBank AF218266), utilizando la

herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov). Los resultados de esta alineación mostraron un 98% de identidad entre el consenso y la secuencia referencial del IHNV, confirmando que el fragmento generado mediante PCR y luego clonado, corresponde a la región seleccionada de IHNV. La discrepancia en 5 nucleótidos con respecto a la secuencia referencial AF218266 posiblemente obedece a los diferentes orígenes geográficos de ambos aislados, aunque no se descarta la introducción de mutaciones durante el proceso de amplificación por PCR.

3.2 Evaluación del marcaje de la sonda con digoxigenina

Para corroborar el procedimiento de marcaje de la sonda nucleica con digoxigenina, así como la metodología básica del dot blot, se realizó una prueba utilizando dos membranas. Para la primera se utilizó sonda marcada con digoxigenina (producto de PCR sintetizado en presencia de 11-DIG-dUTP), mientras que para la segunda se utilizó un producto de amplificación idéntico pero sin marcar. El blanco a detectar fue el mismo fragmento de IHNV que se obtiene mediante PCR utilizando los iniciadores que generan la sonda nucleica (región A). Para la membrana donde se utilizó sonda nucleica marcada, se observaron los puntos o manchas que se generan al obtener una reacción positiva de dot blot. Mientras que para la membrana que se utilizó sonda nucleica no marcada, no se obtuvo reacción alguna.

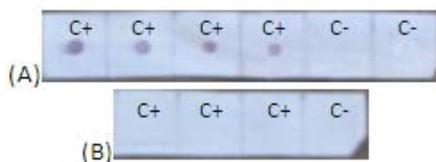


Figura #2. Evaluación de la sonda marcada con digoxigenina. (A) se muestra la membrana donde se utilizó sonda nucleica marcada con digoxigenina. (B) Se muestra la membrana en la que se utilizó sonda nucleica sin marcar.

3.3 Análisis de la sensibilidad típica de la visualización de los resultados en membrana de nylon y en gel de agarosa

Al momento de comparar la sensibilidad típica de los dos medios de visualización de resultados, geles de agarosa y dot blot en membranas de nylon, se obtuvo una mejor sensibilidad utilizando dot blot, pudiendo visualizar productos de una concentración de hasta $3^{pe}/\mu l$; mientras que, al realizar el análisis en los geles de agarosa (1.5%) se llegó a observar hasta una concentración de $2.5^{pe}/\mu l$ (Figura #3). Esta dramática diferencia en la sensibilidad de detección de un fragmento de ADN específico por ambos métodos era lo esperado, y es consistente con la idea de que un método de diagnóstico que incorpora el procedimiento

de dot blot como complemento a la PCR debería incrementar la sensibilidad del diagnóstico basado solamente en visualización de productos de PCR en agarosa.



Figura #3. Evaluación de la sensibilidad de la sonda. Las diluciones corresponden al fragmento A, complementario a la sonda nucleica, 10^0 corresponde a una concentración de $30^{ng}/\mu l$ de ADN.

3.4 Optimización del protocolo de dot blot

3.4.1 Evaluación del tiempo y tipo de secado de las membranas de nylon. El tiempo y el tipo de secado de una membrana, después de ser cargada con el ADN a analizar, fue uno de los puntos que se consideraron para la optimización del protocolo. Para esto, se utilizaron diversas membranas, cargadas con varias diluciones de ADN del fragmento a detectar. Las membranas fueron secadas, ya sea al ambiente o en un horno a $65^{\circ}C$, considerando tiempos variados para los dos tipos de secado.

Las membranas mostraron los mismos resultados en cuanto a eficacia al momento de detectar una cierta cantidad de ADN objetivo. Como se observa en la figura #4. Las membranas (a) y (b), que fueron secadas a temperatura ambiente durante 1 y 2 horas respectivamente, no se diferenciaron de las membranas (c), 1 hora; (d), 2 horas; y (e), 15 minutos; secadas en un horno a $65^{\circ}C$. Los controles negativos no mostraron reacción alguna, indicando que la prueba se desarrolló de forma adecuada.

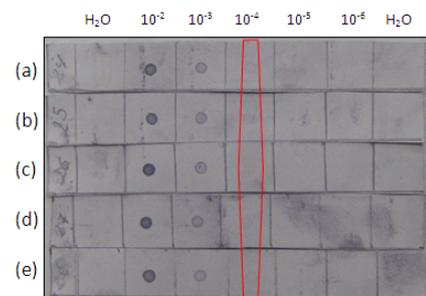


Figura #4. Determinación del tiempo y tipo de secado de las membranas. Dentro del marco se puede observar la última dilución capaz de ser detectada por la técnica, la cual fue la misma en todas las variaciones ensayadas en esta prueba.

Basándose en los resultados obtenidos, se eligió un tiempo de secado de 15 minutos a $65^{\circ}C$ (por ser el más rápido). Sin embargo, debido a que el secado al ambiente no afecta la sensibilidad del ensayo, es posible utilizar esta opción cuando las condiciones experimentales o logísticas lo requieran.

3.4.2 Disminución del tiempo de diagnóstico. La realización de algunas pruebas, en especial acerca del tiempo de hibridación, fue de utilidad para llegar a

optimizar el protocolo de dot blot en lo que se refiere al tiempo necesario para practicar esta técnica. Estas pruebas permitieron establecer un protocolo de diagnóstico mediante el sistema conjunto de PCR/dot blot factible de ser ejecutado en un solo día. En uno de estos ensayos se utilizaron tres membranas conteniendo las mismas muestras en cada una de ellas. Cada una de las tres membranas (a), (b) y (c) fueron expuestas a distintos tiempos de hibridación. Las membranas (b), con 2 horas de hibridación; y (c) con 4 horas de hibridación, mostraron la misma capacidad de detección. Mientras que en la membrana (a), hibridada durante 1 hora, se observó una pequeña reducción en la intensidad de revelado, en especial en las concentraciones cercanas al límite de detección ($3^{ps}/\mu l$) (ver figura #5).



Figura #5. Evaluación del tiempo de hibridación. Las diluciones corresponden al fragmento A, complementario a la sonda nucleica, 10^0 corresponde a una concentración de $30^{ng}/\mu l$ de ADN.

3.4.3 Protocolo optimizado de dot blot

3.4.3.1 Pre-hibridación. La membrana es humedecida en solución 2x SSC (0.75M NaCl; 75mM Citrato de Sodio). Enseguida es sumergida en solución 1 (0.5M NaCl; 0.2N NaOH) durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se sumerge en solución 2 (1M NaCl; 0.5M Tris-Cl pH 8.0) durante 10 minutos. En este momento, la membrana es colocada en recipiente hermético, agregando solución de hibridación con una incubación a $65^{\circ}C$ 30 minutos.

3.4.3.2 Hibridación. La sonda nucleica es llevada a $95^{\circ}C$ durante 3 minutos, para la desnaturalización de la doble cadena. Se renueva la solución de hibridación previamente llevada a $65^{\circ}C$. En este momento, se adiciona a la membrana la sonda inmediatamente después de haberla calentado. La membrana se deja hibridar durante 2 horas a $65^{\circ}C$.

3.4.3.3 Post-hibridación. La membrana se sumerge en solución 2x SSC por 5 minutos. Luego se realiza 6 lavados de 5 minutos cada uno, con solución de lavado 1 (0.2x SSC, SDS 0.1%) a $65^{\circ}C$. Después, se realiza 6 lavados de 5 minutos cada uno, con solución de lavado 2 (0.1x SSC, SDS 0.1%) a $65^{\circ}C$. Por último, la membrana es lavada con solución 0.1x SSC por 5 minutos.

El proceso de revelado incluye la humectación de las membranas con TBS (12mM Tris-Cl pH 7.5; KCl 0.02%; NaCl 0.8%). Enseguida, la membrana es sumergida durante 15 minutos en solución de leche

descremada 5% (diluida en TBS). Se debe enjuagar la membrana con TBS, para luego añadir nueva solución de leche 5% incorporando el anticuerpo (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, Roche) a razón de 1:15000 e incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Finalizado este periodo la membrana es lavada 5 veces con solución TBS. Adicional a esto se lava 2 veces con búfer B (50mM Tris-Cl pH 9.0; 1mM $MgCl_2$; 0.1M NaCl). En este punto se añade la solución reveladora o sustrato (BM Purple AP Substrate precipitating, Roche) hasta observar reacción en los controles positivos de la membrana. Finalmente se da un lavado con búfer B para eliminar el sustrato de la membrana y evitar el ruido que se produce por la presencia del sustrato sobre la misma.

3.5 Comparación de algunos parámetros entre la PCR y el conjunto PCR/dot blot

3.5.1 Análisis de la sensibilidad de la PCR y del conjunto PCR/dot blot. Esta prueba se realizó con el fin de conocer la cantidad mínima de material genético que las técnicas (PCR y PCR/dot blot) requieren para poder emitir un diagnóstico; considerando la hipótesis de que con una cantidad muy pequeña de ADN, la PCR no produce respuesta de diagnóstico, mientras que, el conjunto PCR/dot blot logra expresar respuesta con un rango menor de ADN inicial, en otras palabras el conjunto PCR/dot blot tiene mayor sensibilidad al momento de realizar diagnósticos. Para esto se procedió a detectar, ya sea por PCR o por PCR/dot blot, la presencia del fragmento de ADN blanco en diluciones seriales del producto previamente purificado y cuantificado. Analizando los resultados se observó que, la PCR por sí sola necesitó un mínimo de $2 \times 10^{-10} \text{ ng}/\mu l \approx 2^a/\mu l$ de ADN para obtener una respuesta de diagnóstico (ver figura #6). La cantidad mínima de ADN blanco que el conjunto de PCR/dot blot logró detectar fue de $2 \times 10^{-13} \text{ ng}/\mu l \approx 0.002^a/\mu l$ (ver figura #7). Este resultado demuestra que es posible incrementar la sensibilidad del diagnóstico por PCR aplicando dot blot para la subsecuente detección del producto de amplificación.



Figura #6. Gel de agarosa donde se han migrado las reacciones de PCR usadas para detectar un fragmento de IHHNV diluido serialmente. La cantidad de ADN sustrato usado en cada reacción de amplificación fue ($^{ng}/\mu l$): 1 (2×10^{-7}), 2 (2×10^{-8}), 3 (2×10^{-9}), 4 (2×10^{-10}), 5 (2×10^{-11}), 6 (2×10^{-12}), 7 (2×10^{-13}), 8 (2×10^{-14}), 9 (2×10^{-15}), 10 (2×10^{-16}). Se notan ciertos productos inespecíficos (de distinto tamaño al esperado) en dos de los controles negativos.

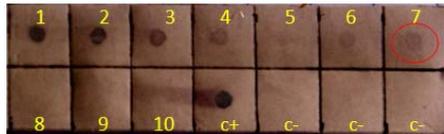


Figura #7. Membrana donde se muestran los resultados obtenidos en una prueba de dot blot aplicada a los productos de amplificación mostrados en la Figura #6. Las muestras son las mismas detalladas en la Figura #6.

3.6 Aplicación del dot blot en los ensayos experimentales para complementar el diagnóstico por PCR

3.6.1 Análisis de reproductores de *P. vannamei*. El análisis constó con un número final de 169 muestras de ADN recolectadas de 50 reproductores de *P. vannamei*. Los animales fueron muestreados en cuatro ocasiones en intervalos de 5 días, para obtener un número considerable de muestras con poca cantidad de animales. La mortalidad durante el transcurso del experimento impidió obtener las 200 muestras que se esperaban. Según los resultados generados, se obtuvo un porcentaje del 79.9% de presencia viral del total de muestras según PCR/dot blot; mientras que el análisis basado en PCR simple, determinó un 69.83% de positivos para las muestras analizadas. Esto indica que el uso del dot blot permitió detectar IHHNV en un 10.07% de muestras adicionales a lo determinado por PCR simple. Así se demuestra que ciertas muestras calificadas como negativas por ausencia de productos de amplificación visibles en agarosa, contienen ADN viral amplificado, el cual puede ser detectado mediante la técnica de dot blot, resultando en un incremento en la sensibilidad del diagnóstico.

De las 50 muestras declaradas como negativas para el virus según la técnica de PCR, 16 muestras (32%) respondieron positivamente al análisis del sistema conjunto PCR/dot blot para el mismo virus. Este resultado advierte las ventajas de completar el diagnóstico basado en PCR con métodos moleculares alternativos, tales como dot blot.

3.6.2 Análisis de juveniles de *P. vannamei*. En este ensayo, un total de 480 muestras fueron analizadas mediante el sistema de PCR simple y el conjunto PCR/dot blot. Basado en los resultados obtenidos mediante el conjunto PCR/dot blot, se determinó un valor del 13.3% (64 muestras) de positivos para el virus del IHHNV; mientras que el análisis realizado por PCR simple detectó un 7.48% (36 muestras) de positivos para el virus.

Durante el análisis de las muestras de juveniles se observó, inesperadamente, un número pequeño del total de muestras (4%) aparentemente positivas para el IHHNV en base a PCR simple, pero negativas mediante PCR/dot blot. Este resultado es inesperado porque el conjunto PCR/dot blot tiene una sensibilidad superior a la PCR (ver figuras #6 y 7), y por tanto se

espera que toda muestra positiva en base a PCR sea también positiva al someterla a la reacción de PCR/dot blot. Existen varias posibles explicaciones para este resultado: puede ser que el producto de amplificación observado en el análisis de PCR en estas muestras coincida en talla con el producto específico, pero sin embargo corresponda a un producto de amplificación inespecífico. En su defecto, es posible que errores técnicos en la ejecución del dot blot hayan impedido la detección de algunas muestras legítimamente positivas.

4. Discusión

La camaronicultura a nivel mundial ha tenido un crecimiento notorio desde sus inicios, sin embargo la arremetida de enfermedades, en especial las causadas por agentes virales, ha ocasionado declives productivos de la actividad; originando que los productores de camarón implementen herramientas más adecuadas, como las técnicas moleculares, para la detección de estos patógenos.

Una de las técnicas moleculares que se utiliza para generar diagnósticos es la PCR; pero ésta, al igual que otras técnicas, tiene sus limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad, lo que puede ocasionar un diagnóstico de poca confiabilidad en algunos casos. Otras técnicas usadas son aquellas basadas en sondas nucleicas; las cuales, en comparación con la PCR, poseen típicamente menor sensibilidad, pero un mayor grado de especificidad.

La estrategia que se planteó al inicio de este trabajo para desarrollar un protocolo de diagnóstico para IHHNV fue tomar ventaja de las bondades de la PCR y del dot blot (este último fue escogido por ser un método sencillo dentro del grupo de técnicas basadas en sondas nucleicas).

Se logró demostrar que la integración de estas dos técnicas (PCR y dot blot) proporciona mejores resultados de diagnóstico de lo que estas dos técnicas podrían mostrar por sí solas. Así, la PCR utilizada tuvo un límite de detección de $2^{28}/\mu\text{l}$, mostrando en algunos casos resultados ambiguos. Por otro lado, el dot blot por sí solo mostró un límite de detección de tan solo $3^{25}/\mu\text{l}$, pero no se evidenciaron falsos positivos ni resultados ambiguos durante las pruebas de evaluación. La sensibilidad del dot blot desarrollado es comparable a lo obtenido por Bedoya en 1996, quien demostró una sensibilidad de hasta $10^{25}/\mu\text{l}$; al desarrollar sondas nucleicas marcadas con digoxigenina para *Vibrio alginolyticus*. La integración de PCR y dot blot en un método de diagnóstico conjunto permitió la detección de hasta $0.002^{25}/\mu\text{l}$, y la resolución de un número importante de resultados ambiguos en pruebas de validación con muestras de *P. vannamei*.

Vale recalcar que los límites de detección aquí reportados corresponden a estimados basados en un ADN generado artificialmente, y cuya concentración

fue estimada mediante espectrofotometría. Ciertos factores, tales como la complejidad y pureza de muestras de ácido nucleico preparadas a partir de tejido, probablemente afectan la capacidad de detección del conjunto PCR/dot blot. Es así que la sensibilidad de estos protocolos en muestras de *P. vannamei* es probablemente menor a la determinada usando un fragmento de ADN viral purificado.

El conjunto PCR/dot blot desarrollado en este trabajo podría ser utilizado para la selección de reproductores necesarios para la producción de larvas de camarón en laboratorios, debido al alto grado de confiabilidad que esta técnica proporciona. Así, se obtendría un lote de larvas con baja prevalencia para un cierto patógeno, en este caso, para IHHNV; reflejando un posible incremento en la producción de este crustáceo, aludiendo la prevalencia baja de una enfermedad que causa deformidades y enanismo, como lo es el RDS.

5. Referencias

- [1] Lightner, D., Redman, R., Bell, T., Brock, J. (1983a) Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J World Maric Soc*, 14: 221-225.
- [2] Lightner, D., Redman, R., Bell, T. (1983b) Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J Invertebr Pathol*, 42: 62-70.
- [3] Tang, K. and Lightner, D. (2002) Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49: 93-97.
- [4] Bell, T. and Lightner, F. (1984) IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 38: 185-194.
- [5] Kalagayan, G., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J., Brock, J. (1991) IHHN virus as an etiological factor in runt deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J World Aquacult Soc*, 22: 235-243.
- [6] Primavera, J. and Quintio, E. (2000) Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J Crustac Biol*, 20: 796-802.
- [7] Berns, K., Bergoin, M., Bloom, M., Lederman, M., Muzuczka, N., Sielg, G., Tal, J., Tattersall, P. (1995) Parvoviridae: VIth report of international committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol Suppl*, 10: 169-178.
- [8] Bonami, J., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M., Lightner, D. (1990) Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J Gen Virol*, 71: 2657-2664.
- [9] Mari, J., Bonami, J., Lightner, D. (1993) Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J Gen Virol*, 74: 2637-2643.
- [10] Shike, H., Dhar, A., Burns, J., Shimizu, C., Jousset, F., Klimplel, K., Bergoin, M. (2000) Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimps is related to mosquito *Breviadenoviruses*. *Virology*, 277: 167-177.
- [11] Lightner, D. (1996a) Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, 15: 579-601.
- [12] Flegel, T. (1997) Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13: 433-442.
- [13] Withyachumnarnkul, B., Chayaburakul, K., Lao-Aroon, S., Plodpai, P., Sritunyalucksana, K., Nash, G. (2006) Low impact of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) on growth and reproductive performance of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69: 129-136.
- [14] Maftah, A. and Julien, R. (1996) *Biologie Moléculaire*. Masson, Paris. Pp. 101, 120-126.
- [15] Cáceres, J., Vásquez, R., García, A. (2006) Diagnóstico de enfermedades infecciosas en organismos acuáticos cultivados, más que una técnica. *Programa Nacional de Sanidad Acuicola*, 9: 1-4.
- [16] Bedoya, C. (1996) Desarrollo y análisis de sondas nucleicas como herramientas de diagnóstico en la larvicultura de camarones Penaeidos. Tesis de Grado, ESPOL.