

DETECCIÓN DEL VIRUS DE “MANCHA BLANCA” EN CAMARÓN DE GRANJA MEDIANTE LA TÉCNICA PCR

Mejía-Ruiz, C. H., Morales-Chapa, C., Unzueta-Bustamante M., Ascencio-Valle, F., y Vázquez-Juárez, Ricardo

RESUMEN

La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es la más valiosa de las herramientas desarrolladas hasta la fecha para la investigación en biología molecular. La capacidad de amplificar un fragmento específico del genoma de un organismo a partir de una secuencia de DNA conocida, ha sido utilizada para determinar desde los niveles de expresión de un gen en particular, en un determinado tejido y en un momento específico, hasta el desarrollo de sistemas de diagnóstico molecular que detectan la presencia de una bacteria, hongo o virus, patógenos para el humano u organismos de cultivo. En la acuicultura, esta técnica ha sido utilizada para la detección de enfermedades cuyo agente causal ha sido un virus, una bacteria o una rickettsia (Lightner y Redman, 1998). Auxiliados por dos juegos de “primers” que fueron diseñados para detectar la presencia del virus mancha blanca (WSSV) en la especie *Penaeus monodon* o camarón tigre (Lo, *et al.*, 1999), en el laboratorio se ha implementado un innovador sistema de diagnóstico para la detección de este virus en el camarón de granja.

Fundamentados en las bondades de la técnica PCR y en la alta sensibilidad y especificidad de su sistema, se han diseñado dos juegos de “primers” que amplifican una región del genoma del WSSV, cuya especificidad reconoce una región de DNA diferente a la de los “primers” diseñados por Lo *et al.* (1998), aun cuando éste se encuentra en pequeñas cantidades (copias) con respecto al DNA del hospedero. El sistema de diagnóstico que hemos implementado fue utilizado para detectar la presencia de WSSV en muestras de camarón (*P. vannamei* o *P. stylirostris*) obtenidas en zonas acuícolas con problemas del noroeste del país. Las ventajas que aporta el sistema contra los kits comerciales son: 1) su sensibilidad y especificidad es duplicada, debido a que permite reconocer dos lugares, regiones diferentes del

genoma viral, y 2) un solo producto de amplificación de cuatro posibles con los que se realiza el diagnóstico, es considerada como positiva, esto permite que pocas copias puedan ser amplificadas y por lo tanto la detección del virus puede realizarse en su etapa inicial.

La calidad de los DNA extraídos de camarón fue primero evaluado con “primers” específicos que amplifican por PCR el gen ribosomal 16S específico del orden decápoda. Posteriormente, se realizaron “pools” de 10 muestras correspondientes a cada granja y se corrieron con los cuatro juegos de “primers”. Las muestras fueron finalmente corridas usando un kit comercial de PCR, obteniéndose los mismos resultados. De esta forma, el sistema de diagnóstico desarrollado en nuestro laboratorio fue ampliamente validado con el kit IQ2000, el cual es utilizado en todo el mundo. Actualmente se está optimizando el sistema para mejorar el tiempo de ejecución y abaratar los costos por reacción. Por otro lado, se presenta además la caracterización parcial del DNA viral a nivel de secuencia, la cual se está realizando a partir de los productos de PCR clonados y mantenidos en nuestro laboratorio.

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre las enfermedades de los camarones de granja datan de la década pasada, por lo que en muchas de ellas se desconoce el agente causal. Según Lightner *et al.*, (1985), existen 30 virus caracterizados, cuatro de ellos (*Baculovirus Penaei*, BP; Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV; Hepatopancreatic Parvo Virus, HPV y; Taura Syndrome Virus, TSV) se les reconoce por tener impacto significativo en los laboratorios y granjas de camarón del continente americano (Lightner, 1996a, Lightner and Redman, 1998). No obstante, existen otros dos virus que actualmente están en proceso de ser evaluados en América: WSSV y YHV (White Spot Syndrome Virus y Yellow Head).

El WSSV o "Mancha Blanca" se describió primeramente en el noreste de Asia a principios de 1993, y rápidamente se observó su dispersión a otros países. En enero de 1999, la presencia de WSSV fue detectada en muestras de tejidos de camarón de granja en tres países centroamericanos: Nicaragua, Guatemala y Honduras. El primer reporte de epizootia se realizó en Honduras, donde los organismos de cultivo mostraron signos de estrés, los cuales son considerados no comunes para el periodo de cultivo. Más adelante, la sintomatología observada fue similar a la del síndrome de Taura (TS) (Jory, D.E., 1999). No obstante, se apreciaron los síntomas característicos para WSSV: letargia, anorexia y presencia de organismos moribundos nadando cerca de la superficie de los estanques. Los organismos presentaron, además, coloración rosada a café rojizo por la expansión de los cromatóforos cuticulares y la presencia de inclusiones blancas embebidas en la cutícula de *P. vannamei*, aunque en *P. stylirostris* no se observaron en fresco. Finalmente, se presentó una rápida y elevada mortalidad, alcanzando tasas de 100% en 3 a 10 días después de los primeros signos clínicos (Jory, D.E., 1999). Por otro lado, aunque en otros países se han identificado variantes no virulentas de WSSV, en México los estudios de una nueva variedad de WSSV aún no son conclusivos. Afortunadamente, es posible la detección rápida y definitiva del WSSV antes de o en los primeros estadios de la enfermedad, mediante técnicas de diagnóstico molecular como: PCR y Dot blot, entre otras (Lo *et al.*, 1999; Jory, D.E., 1999). Aquí se presentan los resultados obtenidos en la detección del WSSV en diferentes muestras de camarón, mediante un sistema de diagnóstico desarrollado en el laboratorio.

METODOLOGÍA

Muestreo y Fijación de muestras

De los camarones seleccionados en cada granja se seccionaron dos pares de pleópodos del abdomen de los organismos, y se fijaron en etanol al 75%, almacenándose a 4 °C, dentro de un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml hasta su procesamiento.

Extracción y evaluación de la calidad del DNA

El DNA se extrajo por el método reportado por Sambrook *et al.* (1989), y modificado según Lo *et al.*, (1999). A partir de 10 µg de DNA obtenidos de cada uno de los diez organismos muestreados por granja, se analizaron primeramente utilizando los "primers" 143F y 145R (todos los "primers" fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM) reportados por Lo *et al.* (1999), y diseñados para amplificar regiones internas del DNA genómico del propio camarón, con el fin de establecer la calidad del DNA para ser amplificado por PCR.

Organización de las muestras de DNA y análisis por PCR

Posteriormente, se realizaron "pooles" de los DNA de cada granja que presentaban buena calidad, y se analizaron contra cuatro diferentes juegos de "primers" diseñados específicamente en el laboratorio para amplificar DNA de WSSV. Los diferentes "pooles" de DNA quedaron definidos como aparece en la tabla I. Dos juegos de "primers" (146F/R1 y 146F/R2) fueron sintetizados según el reporte de Lo *et al.*, (1999), mientras que los otros dos (WSF/R1 y WSF/R2) se diseñaron estratégicamente a partir de las secuencias de DNA de WSSV reportadas en el banco de datos GenBank (Access number: Q92007). El criterio para definir un resultado positivo se estableció obteniendo al menos una amplificación de cada juego de los cuatro "primers". El DNA de WSSV extraído de camarones con infección severa fue utilizado como control positivo, los cuales produjeron amplificaciones de 1447, 941, 436 y 413 pb para los "primers" 146F/R1, 146F/R2, WSF/R1 y WSF/R2, respectivamente. Los parámetros de reacción fueron 94 °C por 12 minutos, un ciclo; 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por dos minutos por 40 ciclos; y un ciclo de 72 °C por cuatro minutos para extensión final. En cada corrimiento de las muestras se ensayó un tubo de reacción con agua bidestilada y estéril como control negativo.

Clonación y Secuenciación de productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos con la Taq polimerasa correspondientes a la amplificación de

las muestras positivas para WSSV, con cada uno de los juegos de "primers" (146F/R1=1447; 146F/R2=941, WSF/R1= 436, y WSF/R2=413 pb), fueron clonados independientemente en el vector pGEM de Promega. La secuenciación de estos fragmentos está siendo realizada con un secuenciador Abi Prism 310 de Perkin-Elmer.

RESULTADOS

En la figura 1 se observan los PCR analizados con los "primers" 143F y 145R que amplifican la región que codifica al RNA ribosomal 16S de decápodos, con ellos se determinó que la calidad del DNA para PCR era óptima en tales muestras. La evaluación con los "primers" WSF1/ WSR1; WSF2/ WSR2; 146F1/146R1; y 146F2/146R2 permitió detectar la presencia de DNA viral específico de WSSV en cuatro de los nueve "pooles". Las muestras que fueron positivas para WSSV se presentan en la figura 2, donde se puede observar con claridad que las muestras CIB2/99, CIB3/99, CIB5/99 y CIB7/99 generaron un único producto con al menos dos de los cuatro juegos de "primers", o sea amplificaron el fragmento de DNA esperado de 316 pb y 1447 pb con los "primers" WSF2/ WSR2 y 146F1/146R1, respectivamente. Un análisis de los nueve "pooles" de DNA corrido posteriormente con el kit IQ2000 de PCR para detectar WSSV y ampliamente utilizado en Centroamérica y Asia produjo exactamente los mismos resultados (figura 3) que los obtenidos con los "primers" diseñados y analizados en el laboratorio.

La caracterización de los productos de PCR clonados, realizada mediante análisis de restricción y secuencia, muestra el tamaño de fragmento de DNA esperado y, simultáneamente, la secuencia nucleotídica correspondiente al fragmento de 917 pb, que es hasta el momento la secuencia que más datos se tiene. El alineamiento de su secuencia, utilizando el algoritmo BLAST, contra las secuencias nucleotídicas del banco de datos GenBank, muestran una identidad de 99% con la secuencia reportada del WSSV (baculovirus) aislado de *P. monodon* (Lo y Kou 1997; GenBank accession number: U50923).

DISCUSIÓN

Los resultados arriba descritos evidencian la presencia del Síndrome de la Mancha Blanca en camarones penecidos de algunas granjas del noroeste

del país. La sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR, junto con los criterios manejados para determinar si un resultado es positivo o negativo, permitió observar que sólo las muestras CIB2/99, CIB3/99, CIB5/99 y CIB7/99 (4 de 9) fueron positivas, las restantes cinco granjas no evidencian la presencia de DNA de WSSV, bajo ninguno de los juegos de "primers". Estos resultados fueron ampliamente confirmados con el kit comercial para detectar WSSV mediante PCR. Por tanto, se puede concluir: 1) la implementación de la técnica de PCR para detectar WSSV en muestras de camarón infectado es exitosa; 2) los "primers" seleccionados y diseñados amplifican exclusivamente regiones de DNA del WSSV y no de DNA de camarón; 3) el tratamiento de fijación para ser procesadas para PCR fue el adecuado en la mayoría de los organismos muestreados; 4) en la fecha que fueron muestreados, 4 de las 9 granjas de camarón resultaron con organismos infectados con WSSV.

PERSPECTIVAS

- 1) Es posible definir cuántos y cuáles de los organismos de cada "pool" estaba infectado; lo que se piensa realizar cuando sea requerido.
- 2) Se están secuenciando los productos de PCR de las muestras positivas para iniciar la caracterización de la variedad de WSSV.
- 3) Los mismos fragmentos amplificados han sido clonados para que sean utilizados en la optimización del kit de diagnóstico, así como en su caracterización y desarrollo de sondas moleculares.
- 4) Se diseñarán otros sistemas de diagnóstico molecular que detecten otros patógenos que afectan la camarinocultura, tanto bacterias como virus. Actualmente se están haciendo los primeros análisis para detectar el virus "cabeza amarilla" o "Yellow Head".

BIBLIOGRAFÍA

- Jory, D.E., 1999. Shrimp white spot virus in the western hemisphere. *Aquaculture Magazine*. Vol. 25 No. 3. Pp. 83-91.
- Lightner, D.V., 1985. A Review of the diseases of cultured penaeid shrimp and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. pp 79-103. En: Taki, Y; J.H. Primavera, J.A. Llobrera (eds.) 1985. *Proceedings of*

the first international conference on the culture of penaeid prawns/shrimp.

Lightner, D.V., 1996a. The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: apizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, 15(2):579-601.

Lightner, D.V., 1996b. A handbook of shrimp pathology and diagnostics procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Section 3: Viruses. World Aquaculture Soc. Baton Rouge, LA.

Lightner, D.V. and Redman, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostics methods. *Aquaculture*, 164:201-220.

Lo, C.F. Hsu, H.C. Tsai, M.F. Ho, C.H. Peng, S.E. Kou, G.H. Lightner, D. V., 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis. Aqua. Org.* 35: 175-185.

Sambrook, A. Maniatis, F. Fritsh, A., 1989. *Molecular Cloning Protocols*. Cold Spring Harbor.



Tabla 1.-Resumen de resultados de la prevalencia al WSSV en muestras analizadas colectados en granjas de cultivo de camarón en las costas de Sonora y Sinaloa.

CLAVE GRANJA	No. ORGS/MUESTRA	"POOL" PCR (+)
CIB1/99	10	-
CIB2/99	10	+
CIB3/99	10	+
CIB4/99	4	-
CIB5/99	10	+
CIB6/99	10	-
CIB7/99	10	+
CIB8/99	10	-
CIB9/99	10	-

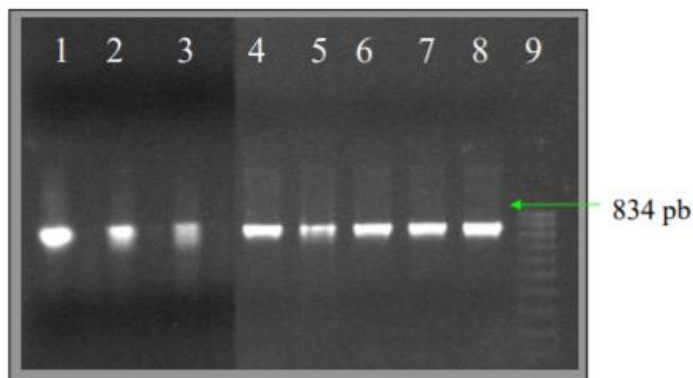


Figura 1.- Control externo: Amplificaciones de DNA de camarón obtenidas con los "primers" 143F y 145R. La figura muestra que la calidad de los DNAs es apta para ser utilizado en la detección de DNA viral

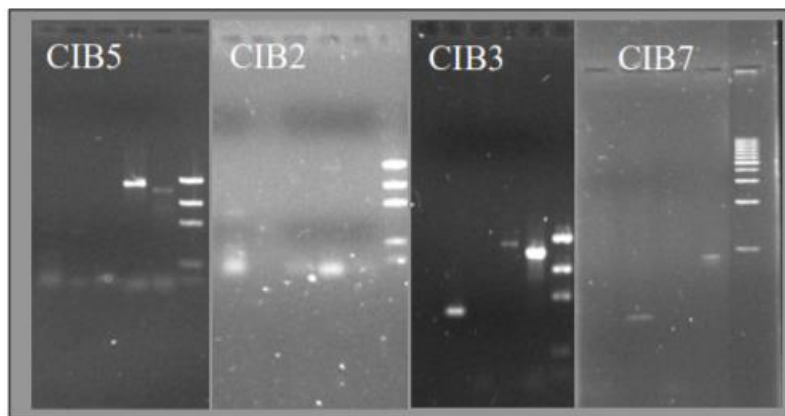


Figura 2.- Los gels muestran las amplificaciones obtenidas con diferentes juegos de "primers". En las cuatro muestras donde resultó positiva la detección de WSSV, se amplificaron al menos dos de cuatro regiones de DNA.

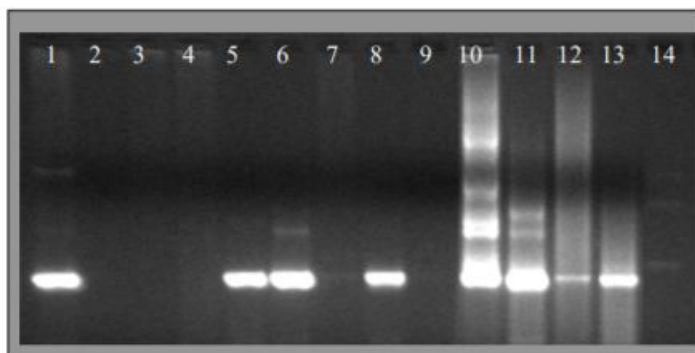


Figura 3.- Resultados del PCR para las muestras de camarones de 9 granjas de Sonora y Sinaloa, vistas en un gel de agarosa al 1.5%. Las muestras positivas a WSSV están representadas en los carriles 1, 5, 6 y 8. Los carriles 2, 3, 4, 7, y 9 son muestras con resultados negativos. Los carriles 10, 11, 12 y 13 son controles positivos. El carril 14 es el Marcador de Pesos Moleculares.