

Detección y cuantificación del virus de linfocistis (LCDV) en doradas (*Sparus aurata* L.) cultivadas mediante PCR a tiempo real

I. Cano¹, B. López-Jimena², E. García-Rosado², M.C. Alonso², D. Álvarez-Torres², J.B. Ortiz-Delgado*, D. Castro², J.J. Borrego², C. Sarasquete^{1*}

¹ Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC). Campus Universitario Río San Pedro. Puerto Real. Cádiz. España. carmen.sarasquete@icman.csic.es, jjborrego@uma.es

² Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Málaga
* Unidad Asociada de Calidad Ambiental y Patología Molecular (UCA & CSIC)

Abstract

A real-time PCR assay was developed for rapid, sensitive and quantitative detection of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) in gilt-head seabream (*Sparus aurata*) tissues. The assay used SYBR Green chemistry with specific primers targeting the major capsid protein (MCP) gene. The detection limit of this assay was 1 gene copy/reaction. A linear relationship was observed between the amount of template DNA and cycle threshold (C_T) values over a range of 1 to 10^6 copies of the viral genome. Overall intra- and inter-assay variability for C_T values were 1,53% and 2,17%, respectively. Melting curve analysis showed that there was no evidence of non-specific amplification. A linear relationship was also observed between viral genome concentration and TCID₅₀ values. Gilt-head seabream β -actin gene was used as internal control. The assay was applied successfully to quantify LCDV in tissue samples from diseased and asymptomatic fish.

Justificación

La enfermedad de linfocistis es la patología viral más frecuentemente detectada en el cultivo de la dorada (*Sparus aurata*, L.). Su agente causal es el virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV), miembro de la familia *Iridoviridae*. Recientemente se han desarrollado diversos protocolos de detección del LCDV, tanto inmunológicos como basados en la PCR e hibridación de ácidos nucleicos, que han permitido la detección del virus tanto en peces enfermos como asintomáticos (Cano *et al.*, 2006, 2007). Sin embargo estas técnicas de detección no permiten la cuantificación de la carga viral presente en los tejidos analizados. En el presente trabajo se ha puesto a punto un ensayo de detección y cuantificación absoluta del LCDV en dorada, basado en la PCR a tiempo real, que se ha aplicado con éxito para la detección y cuantificación del virus en muestras de doradas enfermas y asintomáticas.

Material y Métodos

Los cebadores para la PCR a tiempo real se diseñaron utilizando la secuencia de un fragmento de 609 pb del gen que codifica para la proteína mayoritaria de la cápside (MCP) de un aislado de LCDV obtenido de lesiones de dorada, y clonado en un vector plasmídico (TOPO Cloning Vector, Invitrogen). Dichos cebadores amplifican un fragmento de 150 pb del gen de la MCP. El ensayo de PCR a tiempo real se realizó con el sistema 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystem), utilizando placas de 96 pocillos. La reacción tuvo lugar durante 40 ciclos de amplificación, con una temperatura de anillamiento de 60°C, añadiéndose finalmente un análisis de curva de disociación con el fin de determinar la T_m del amplicón generado. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Para determinar la sensibilidad del ensayo se realizaron diluciones decimales del plásmido recombinante conteniendo el fragmento del gen de la MCP, obteniéndose una curva estándar. Para los análisis de regresión y el cálculo de la eficiencia de la amplificación (E) se usó el software SDS V. 3 (Applied Biosystem).

La variabilidad intra-ensayo se determinó utilizando tres diluciones del ADN viral analizadas por triplicado en un mismo ensayo de PCR, mientras que para determinar la variabilidad inter-ensayo se emplearon los datos procedentes de tres análisis de PCR independientes. En cada caso, el coeficiente de variación (CV) se calculó como el ratio entre la SD y la media de la C_T de las réplicas.

La correlación entre el número de copias del genoma viral y su título infectivo (TCID₅₀) se determinó mediante análisis de regresión.

Finalmente se analizaron una variedad de muestras de dorada, tanto peces enfermos como larvas y juveniles sin síntomas aparentes. Como control negativo se usó ADN de ejemplares de dorada no infectados, analizados previamente mediante PCR convencional (Cano *et al.*, 2007). Para confirmar la calidad del ADN extraído se amplificó en paralelo un fragmento de 150 pb del gen que codifica para la β -actina de dorada, utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia depositada en GenBank (Santos *et al.*, 1997). La cuantificación absoluta de las copias de ADN del LCDV en las muestras analizadas se determinó median-

te extrapolación de los valores de C_T obtenidos con respecto a la curva estándar incluida en cada ensayo. La carga vírica se expresó como el número de copias de ADN viral por mg de tejido.

Resultados y Discusión

Para evaluar la especificidad de la PCR a tiempo real diseñada se determinó el valor de T_m de los productos de amplificación a partir de la curva de disociación en todos los ensayos realizados. Todas las muestras positivas (tanto ADN plasmídico como muestras de doradas infectadas) presentaron un pico específico en torno a 77 °C. Los valores de C_T obtenidos para muestras negativas (agua y muestras de doradas no infectadas) fueron siempre superiores a 34 ciclos, no obteniéndose amplificaciones específicas.

Para determinar la sensibilidad del ensayo se utilizaron diluciones decimales seriadas de un plásmido recombinante que contenía un fragmento del gen de la MCP viral. Se observó una relación lineal entre la cantidad de DNA utilizado como molde y los valores de C_T para un rango entre 1 y 10^6 copias de genoma viral. La eficiencia de amplificación obtenida fue del 98%.

El ensayo de PCR mostró una precisión y reproducibilidad aceptables, con valores de CV intra-ensayo e inter-ensayo de 1,66% y 2,17%, respectivamente.

El análisis de los datos también revela una buena correlación entre el número de copias y el título infectivo ($R^2 \geq 0,98$). Los valores de C_T variaron entre $16,17 \pm 0,06$ para 5×10^5 TCID₅₀ y $30,73 \pm 0,34$ para 5 TCID₅₀, lo que equivale a $2,2 \times 10^3$ y 1,2 copias de ADN viral, respectivamente.

El ensayo desarrollado presenta un amplio rango dinámico ($6 \log_{10}$), lo que hace que pueda ser útil para analizar muestras con muy diversa carga vírica. En este sentido, el análisis de tejidos de doradas con síntomas clínicos de linfocistis reveló que contenían una carga viral entre 10^4 y 10^2 copias/mg, mientras que en muestras de huevos, larvas y alevines asintomáticos la carga viral estimada fue de 22 a 0,3 copias/mg. Estos resultados avalan el protocolo desarrollado para la detección y cuantificación de LCDV en distintos tipos de muestras de doradas, lo que permitirá su aplicación a estudios de patogénesis y transmisión del LCDV.

Agradecimientos

Irene Cano es investigadora contratada en el ICMAN-CSIC, subvencionada a través de Ayudas del Fondo Social Europeo I3P-CSIC, y en el marco de los proyectos del Plan Nacional (AGL-2007-63380; IP: Juan José Borrego y AGL2006-13777-C03-02; IP: Carmen Sarasquete). Gracias especiales a Dña Isabel Viaña (Ayudante Investigación CSIC) por su asistencia técnica

Bibliografía

- Cano I., Alonso M.C., García-Rosado E., Rodríguez Saint-Jean S., Castro D., Borrego J.J. 2006. Detection of lymphocystis disease virus (LCDV) in asymptomatic cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.) using an immunoblot technique. *Veterinary Microbiology* 113, 137-141.
- Cano I., Ferro P., Alonso M.C., Bergmann S.M., Römer-Oberdörfer A., García-Rosado E., Castro D., Borrego J.J. 2007. Development of molecular techniques for detection of lymphocystis disease virus (LCDV) in different marine fish species. *Journal of Applied Microbiology* 102, 32-40.
- Santos C.R., Power D.M., Kille P., Llewellyn L., Ramsurn V., Wigham T., Sweeney G.E. 1997. Cloning and sequencing of a full-length sea bream (*Sparus aurata*) beta-actin cDNA. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)* 117, 185-189.