

Detección del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) en Trucha Arcoiris mediante RT-PCR y clonación del gen VP2

Zermeño Ortega Miriam R.¹, De la O Contreras Carmen M.², Manjarrez Nevarez Laura A.³, Reyes Martínez Reyna⁴

Laboratorio de Química Clínica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Universitarios s/n, Nuevo Campus Universitario, C.P. 31125. Chihuahua, Chihuahua, México., Autor de correspondencia: mrzermeno@uach.mx

Resumen- La truticultura es una actividad que día con día adquiere una mayor importancia en el país, ya que para el 2005, generó un valor de 74 millones de pesos, teniendo una producción de 120 toneladas anuales en 120 granjas distribuidos por todo el estado. Debido al crecimiento tan elevado de esta industria se ha recurrido a la importación de crías y huevos, generándose el riesgo de la diseminación de enfermedades infecciosas que perjudican económicamente la producción de trucha. Una de las enfermedades originadas por la importación de organismos acuáticos es la causada por el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), causando un alto porcentaje de mortalidad, ya que no se cuenta con un tratamiento o vacuna específica para controlarla. El manual de diagnóstico para enfermedades de organismos acuáticos establece que la detección de este virus se basa en su aislamiento y posterior identificación por métodos serológicos o moleculares. Sin embargo, tiene la desventaja de que consume tiempo y requiere de altos costos. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la técnica de RT-PCR como método rápido de detección de IPNV en tejido de trucha arcoiris, además de clonar los fragmentos correspondientes al gen que codifica para la proteína VP2 del IPNV. Mediante la técnica de ELISA se detectaron 5 muestras positivas al IPNV, partiendo de tejido de trucha arcoiris, sin embargo, RT-PCR no fue efectiva en la detección de este agente viral de dichas muestras positivas, quedando abierta la posibilidad de la modificación de diversas variables para estandarizar la técnica. Se establecieron las condiciones óptimas de RT-PCR para la identificación del virus partiendo de cultivo celular y se clonaron 5 productos específicos del gen que codifica para la proteína VP2, iniciando así una nueva línea de trabajo para la generación de una vacuna que ayude al control de la necrosis pancreática infecciosa.

I. INTRODUCCIÓN

El sector pesquero y acuícola abarca el conjunto de actividades que tienen origen en el aprovechamiento de los recursos de la flora y fauna acuáticas, se especializa en la captura y el cultivo de esos recursos, su transformación y comercialización. La importancia de esta industria es el incremento de la oferta de alimentos de alto valor nutritivo, los cuales están destinados a mejorar la nutrición de los grupos

Abstract- Truculture is an activity that day by day acquires a greater importance in the country, since by 2005, it generated a value of 74 million pesos, having a production of 120 tons per year in 120 farms distributed throughout the state. Due to the high growth of this industry, the importation of offspring and eggs has been used, generating the risk of the spread of infectious diseases that economically harm the production of trout. One of the diseases caused by the importation of aquatic organisms is that caused by the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), causing a high percentage of mortality, since there is no specific treatment or vaccine to control it. The diagnostic manual for diseases of aquatic organisms states that the detection of this virus is based on its isolation and subsequent identification by serological or molecular methods. However, it has the disadvantage that it consumes time and requires high costs. The objectives of this work were to evaluate the RT-PCR technique as a rapid method of detection of IPNV in rainbow trout tissue, in addition to cloning the fragments corresponding to the gene encoding the IPNV VP2 protein. By means of the ELISA technique, 5 positive samples were detected to the IPNV, starting with rainbow trout tissue, however, RT-PCR was not effective in detecting this viral agent of positive samples, leaving the possibility of modifying several variables open to standardize the technique. The optimal RT-PCR conditions for virus identification were established based on cell culture and 5 specific products of the gene coding for the VP2 protein were cloned, thus initiating a new line of work for the generation of a vaccine that helps control of infectious pancreatic necrosis.

mayoritarios de la población, la generación de empleo e ingresos económicos para la misma, así como también el hecho de que es una fuente de insumos para la industria alimentaria y de divisas para el país (Álvarez y cols., 1999; SEMARNAP, 1998).

La acuicultura es una disciplina nueva en comparación con la agricultura, y su desarrollo ha sido necesario por el aumento de la demanda de productos de origen acuático, derivado del incremento poblacional, por lo que

es considerada como la industria productora de alimentos con mayor dinamismo en el mundo actual (CONAPESCA, 2000).

Por la misma razón, su desarrollo se ha llevado a cabo en ocasiones con un alto costo en cuanto a desarrollo de tecnologías, capacitación, exposición a factores ambientales y por supuesto con un mayor riesgo de aparición de enfermedades que en las oblaciones silvestres (SEMARNAP (PRONALSA), 1998).

Los problemas de índole sanitario en las granjas acuícolas, han representado el mayor riesgo a las mayores pérdidas en la última década, refiriéndose específicamente las grandes pérdidas económicas de los productores en el área de la industria acuicultora.

Debido a que la sanidad acuícola ha adquirido una gran importancia, en 1992 en el país se creó el Programa Nacional de Sanidad Acuícola que tiene como finalidad responder a las demandas sobre sanidad en cada uno de los estados de la república, favoreciendo así la productividad y la calidad de los productos generados por dicha industria (SEMARNAP (PRONALSA), 1998).

En los países desarrollados, más que atender enfermedades terminales se les da énfasis a programas de prevención entre la comunidad interesada para evitarlas, y representa uno de los logros más importantes en este combate. Esta es una de las principales metas del Programa Nacional de Sanidad Acuícola (PRONALSA), en donde para lograr un avance con rumbo difunde las recomendaciones, leyes y normas tanto internacionales como nacionales, entre las primeras esta la Organización Mundial para la Sanidad Animal con la Organización Internacional de Epizootias (OIE) que desglosa y caracteriza a todas las enfermedades que representan altos riesgos en la industria acuicultora. En nuestro país contamos con las normas oficiales mexicanas NOM – 010-PESC-1993, NOM-011-PESC-1993 y. NOM-030-PESC-2000 y NOM-EM006-PESC-2002 cuya observancia permite desarrollar una industria acuicultura sustentable (CONAPESCA, 2007; SEMARNAP (PRONALSA), 1998).

Actualmente el cultivo de trucha arcoíris es una actividad de gran importancia en el país la cual se ha distribuido ampliamente, en los estados de México, Puebla, Hidalgo, Veracruz, Michoacán, Chihuahua, Durango, Oaxaca, Jalisco, Morelos, Guanajuato, Nuevo León, Querétaro, Guerrero y Ciudad de México.



Figura 1: Granjas acuícolas del país

Debido al crecimiento tan elevado de esta industria el abasto de huevecillo y cría de trucha arcoíris han sido insuficientes en el país, por lo que se ha recurrido a importar los mismos, principalmente de EUA. Esta movilización de organismos ha provocado el riesgo en la introducción y la diseminación de enfermedades infecciosas que perjudican la producción de trucha en el estado,

Una de las enfermedades generadas por la importación de organismos acuáticos es la necrosis pancreática infecciosa, una enfermedad de origen viral que afecta principalmente las etapas de cría hasta los cinco centímetros de la trucha arcoíris causando un alto porcentaje de mortalidad, ya que no se cuenta con un tratamiento o vacuna específica para controlarla, lo cual se traduce directamente en pérdidas económicas para los productores. Los métodos de control de esta enfermedad infecciosa en México se basan en el establecimiento de programas de control por parte de las autoridades correspondientes, y es conveniente la inmovilización de los organismos infectados, así como la destrucción total de los mismos, acompañados de sanitización del área donde se originó el problema como es recomendado por la OIE en su edición del 2006.

En enero del 2000 una granja de trucha arcoíris en la región central de México reportó por primera vez signos clínicos típicos de necrosis pancreática infecciosa en crías de trucha arcoíris, además se reportó que se presentó alta mortalidad en pocas semanas. Este grupo de peces fue originalmente importado de Estados Unidos, en un lote de 300,000 huevos oculados en noviembre del 1999 (Ortega y cols., 2002).

De acuerdo al manual de diagnóstico para enfermedades de animales acuáticos del 2006 se establece que el diagnóstico de IPNV se basa en el aislamiento viral en cultivo celular seguido por la identificación por pruebas inmunológicas o moleculares. Sin embargo, este proceso requiere de largos periodos de tiempo para emitir un resultado, además de ser muy costoso, siendo estas grandes desventajas para

tener un diagnóstico oportuno y tener elementos para controlar la enfermedad, por lo que se pretende buscar nuevas estrategias que ayuden a una rápida detección del agente viral, lo que ayudara además al establecimiento de programas de control de la necrosis pancreática infecciosa.

Dentro de las estrategias buscadas, se encuentran las técnicas moleculares, principalmente la reacción en cadena de la polimerasa acoplada con retrotranscripción (RT-PCR), la cual ha mostrado mayor sensibilidad y rapidez que el aislamiento en cultivo celular para la identificación de IPNV. (Blake y Col; 1995; Dopazo y Col; 1994; López-Lastra y Col., 1994; Rimstad y Col; 1990; Rodríguez y Col; 2001; Taksdal y Col; 2001; Wang y Col; 1997).

Dentro de los programas de control de vigilancia epidemiológica que podrían establecerse mediante un diagnóstico rápido y específico del IPNV, se pretende a largo plazo incluir la vacunación en donde la clonación de fragmentos del gen VP2 de estos virus obtenidos mediante RT-PCR formen parte inicial de la estrategia para la creación de una vacuna comestible.

Los objetivos de este trabajo son evaluar la técnica de RT-PCR como método de detección del IPNV a partir de tejido de trucha arcoíris, donde a su vez se obtendrá un producto de la proteína VP2 que será clonado con la perspectiva de comenzar la creación de una vacuna que pueda ser usada como prevención sanitaria.

II. METODOLOGÍA

Se manejaron muestras de tejido de trucha arcoíris, huevos, alevines, peces ≥ 5 cm y reproductores de los cuales después de su procesamiento se realizó ELISA para detección de IPNV (Test-line Ltd. Clinical Diagnostics) las muestras que resultaron positivas se realizó extracción de RNA total probando varios métodos: Aquapure RNA Isolation Kit (BIORAD), Trizol (Invitrogen), método de Valderrama – Chaires y Col., 2002 modificado y RNA con tratamiento enzimático. El RNA extraído se cuantificó por espectrofotometría para proceder a la síntesis de cDNA (Promega) bajo las siguientes condiciones: 1 μ g de RNA total, 20 pmol del primer sentido o antisentido y se llevó el volumen a 5 μ L con agua en DEPC, esta mezcla se incubó 5 min., a 70 C, se agregó la siguiente mezcla: 6.1 μ L de agua en DEPC, 4 μ L de buffer de reacción 5X, 2.4 μ L de Cloruro de magnesio 25 mM, 0.5 μ l de inhibidor

ribonucleasa U/ μ l, 1 μ l de dNTP 10 mM, 1 μ l de transcriptasa reversa Improm-II, la reacción final se incubó a 25° C 5 minutos, 42° C 60 minutos y 70° C por 15 minutos. Para la PCR se probaron cinco diferentes juegos de primers: DIAIPN, PrD, PrF, UACH y Rodríguez, cada juego de primers se usó bajo diferentes condiciones de reacción según lo reportado (Taksdal y col., 2001; Wang y col., 1997; Rodríguez y col., 1995; Rodríguez y col., 2001) los productos fueron analizados en geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Previo a la clonación de los productos del gen de la proteína VP2 se realizó una purificación por columna, además se hizo RT-PCR para lograr la amplificación del gen completo VP2 utilizando primers reportados por Moon y col. En el 2004. Para la clonación de los productos amplificados se utilizó pMOSBlue Blunt Ended Cloning kit, Amersham Biociences, células competentes E. coli MOSBlue y DH5 α . Se determinó el tamaño del inserto por PCR y se extrajo el ADN por Miniprep (Sambrook y cols., 1989).

III. RESULTADOS

Fueron analizadas por ELISA un total de 51 muestras de tejido de trucha arcoíris y un virus aislado de cultivo celular. Siendo positivas el 10% de las muestras provenientes tanto del estado de Chihuahua como del estado de México. Se probaron 4 diferentes métodos de extracción de RNA total que se observan en la Figura No. 2:

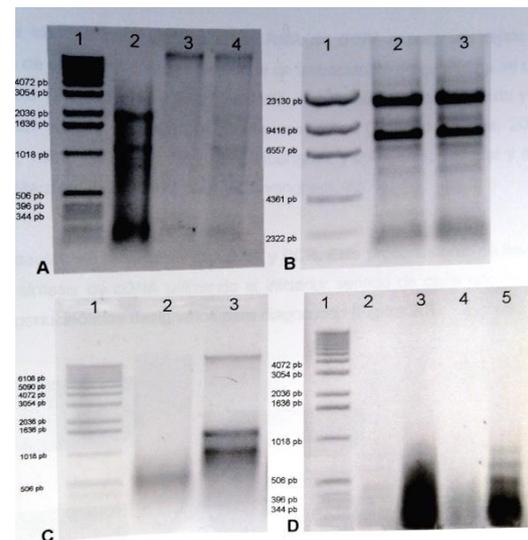


Figura 2: Optimización de la extracción de RNA total. Imágenes analizadas en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. A. Protocolo Aquapure RNA Isolation. Carriles 1: MPM 1 Kb DNA Ladder; 2, 3, 4: Muestras de tejido de trucha arcoíris. B. Protocolo Trizol. Carriles 1: MPM DNA λ /HindIII; 2 y 3: Muestras de tejido de trucha arcoíris. C. Protocolo Valderrama-

Cháirez y col., 2002. Carriles 1: MPM 1 Kb DNA Ladder; 2 y 3: Muestras de tejido de trucha arcoíris. D. Protocolo tratamiento enzimático del RNA total. Carriles 1: MPM 1 Kb DNA Ladder; 2: RNA sin tratar; 3: RNA tratado con Dnasa y Proteinasa K; 4: RNA tratado con Dnasa; 5: RNA total tratado con proteínasa K.

Con RNA Aquapure se logró extraer en promedio 4.3 ng/μl de RNA total, además de observar presencia de DNA y muestras en donde no hay evidencia de RNA. Para el método de trizol en promedio se extrajo 980 ng/μl, mientras que con Valderrama-Cháirez y cols. 2002 un promedio de 2400 ng/μl pero con presencia de DNA y muestras sin evidencia de RNA. Para el protocolo con tratamiento enzimático no hubo señal en la cuantificación de RNA. Siendo el protocolo con el reactivo Trizol el más efectivo para la extracción del RNA total basándose en la concentración y calidad del mismo en comparación del resto de los métodos.

Los primers usados para la técnica de RT-PCR amplifican fragmentos localizados dentro del gen que codifica para la proteína VP2, excepto los denominados DIAIPN. Para la PCR usando los iniciadores denominados como UACH el resultado fue un bandeo inespecífico, los primers Rodríguez y cols., 2001 amplificaron un producto de tamaño muy cercano al esperado (613 pb) el cual no pudo ser secuenciado por falta de concentración necesaria. El diagnóstico de IPNV con los primers DIAIPN fue positivo con las condiciones utilizadas generando un fragmento de 213 pb. El uso de los primers PrD fue positivo amplificando un fragmento de 274 pb mientras que los PrF dieron un bandeo inespecífico, siendo entonces los primers identificados como DIAIPN y PrD los que ofrecieron los mejores resultados para la detección de IPNV, siendo sus secuencias las siguientes:

5'ATCTGCGGTGTAGACATCAAAG3' y 5'TGCAGTTCCTCGTCCATCCC3' (DIAIPN);
5'CGGAAATACGACATCCAGAGC3' y
5'TGGCTCCGTTTCATGGACTGG3' (PrD)
(Figura 3).

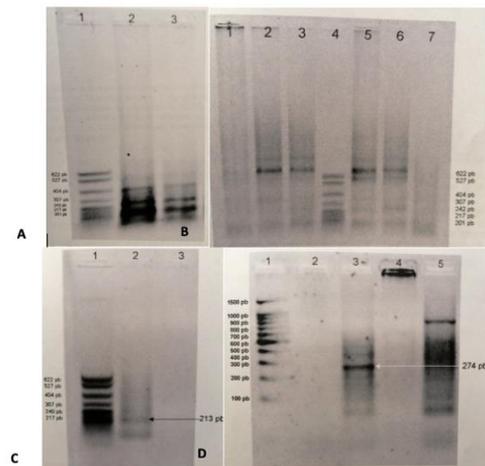


Figura 3: Productos de RT-PCR de diagnóstico para IPNV de tejido de trucha arcoíris con: A) Primers UACH Carriles 1 MPM pBR322/Mspl; 2 y 3. Muestras de tejido de trucha arcoíris. B) Primer Rodríguez y col., 2001 Carriles 1 Muestra de tejido de trucha arcoíris con temperatura de alineamiento de 55° C; 2 Muestra de tejido de trucha arcoíris con temperatura de alineamiento de 58° C; 3 Muestra de tejido de trucha arcoíris con temperatura de alineamiento de 62° C; 4 MPM pBR322/Mspl; 5 Muestra de tejido de trucha arcoíris con temperatura de alineamiento de 64° C; Muestra de tejido de trucha arcoíris con temperatura de alineamiento de 66° C y 7 Control negativo. C) Primers DIAIPN Carriles 1 MPM pBR322/Mspl; 2 Muestra de tejido de trucha arcoíris; 3 Control negativo. D) Carriles 1 MPM 100 pb Ladder; 2 Control negativo; 3 Primers PrD; 5 Primers PrF.

Tratando de eliminar la cantidad de productos inespecíficos se procedió a realizar la RT-PCR con primer antisentido obteniendo los siguientes resultados, figuras 4 y 5:

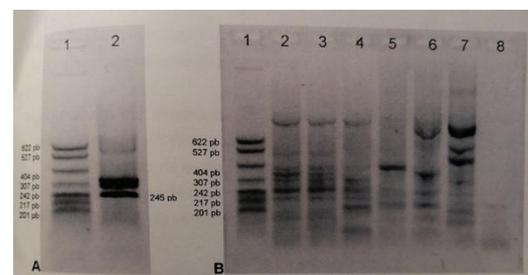


Figura 4: Productos de RT-PCR con primers DIAIPN. Gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. A. Carriles 1 MPM pBR322/Mspl; 2 Control positivo (aislado de cultivo celular). B Carriles 1 MPM pBR322/Mspl; 2,3 y 4 Muestra de tejido de trucha arcoíris; 5 Bagre; 6 Tilapia; 7 Carpa y 8 Control negativo (agua).

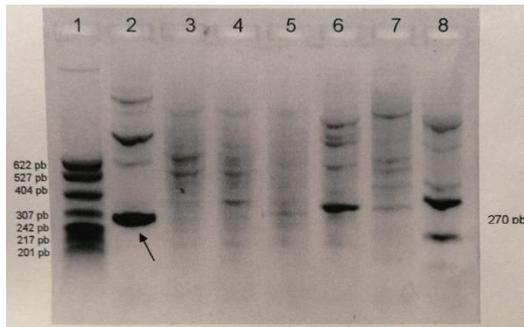


Figura 5: Productos de RT-PCR con primers PrD. Gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 MPM pBR322/MspI; 2 Control positivo (aislado de cultivo celular). 3, 4 y 5 Muestra de tejido de trucha arcoíris; 6 Bagre; 7 Tilapia; 8 Carpa.

El producto obtenido en el control positivo fue purificado para su secuenciación nucleotídica, confirmándose que se trataba de un fragmento que va del nucleótido 420 al 464, dentro del gen que codifica para la proteína VP2 del IPNV, con un 99% de similitud a la cepa Buhl (figura 6).

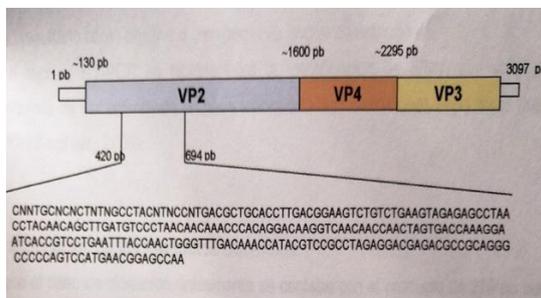


Figura 6: Secuencia del fragmento de 270 pb y su alineamiento dentro del segmento A del IPNV.

Se realizó la clonación de varios fragmentos amplificados con los primers denominados FVP2, IPNVVP2 y TVP2 (Moon y cols., 2004), el fin de usar varios primers fue amplificar el gen VP2 completo. Los productos clonados fueron identificados como M1-4, M3-1, D2-2, D2-8 y D2-4 cuya secuencia mostró si alineación dentro del segmento A del IPNV en locus del gen VP2 abarcando M1-4 del nucleótido 1-250. D2-4 del 17 al 425, D2-2 del 428 al 766. D2-8 del 204 al 753 y finalmente M3-1 del 140-261.

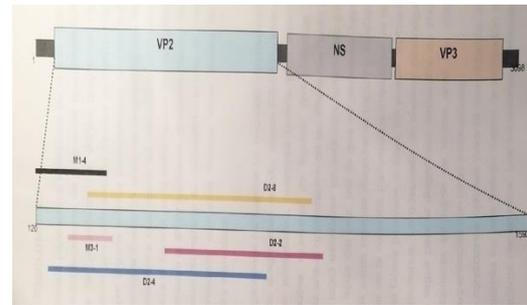


Figura 7: Segmento A del IPNV (arriba) y gen que codifica para la proteína VP2 (abajo) con la ubicación de los fragmentos clonados

IV. CONCLUSIÓN

A partir del primer brote de necrosis pancreática infecciosa en nuestro país se comenzó con el establecimiento de programas que atendieron la sanidad en salmónidos, siendo una de las prioridades el diagnóstico oportuno, comprobando que la técnica de ELISA proporciona resultados precisos y con rapidez para el control de la enfermedad, ya que como se demostró se detectó al IPNV directamente del tejido de trucha arcoíris sin la necesidad de realizar un cultivo celular.

Las técnicas moleculares como RT-PCR ofrecen mayor o igual sensibilidad que el aislamiento a menor costo y tiempo, sin embargo, requiere de una ardua optimización, dejando entonces con este trabajo abierta la posibilidad de seguir realizando más ensayos que logren establecer el protocolo estandarizado para detectar IPNV directamente del tejido, sin la necesidad de cultivo celular. Aun así, como se demostró que el mejor resultado de la muestra aislada en cultivo celular pudo ser confirmada a IPNV por RT-PCR y secuenciación con el uso de los primers denominados PrD (Wang y cols. 1997).

Se logró establecer un protocolo de clonación efectivo, logrando clonar cinco productos específicos del gen VP2 del IPNV, propiciando el inicio de una nueva línea de trabajo para la generación de una vacuna comestible que ayude a controlar el agente causal de la enfermedad en el país, ya que actualmente no existe una vacuna recombinante disponible que ofrezca una protección inmunológica.

REFERENCIAS.

Álvarez P., Ramírez C., Orbe A. 1999. Desarrollo de la Acuicultura en México y Perspectivas de la Acuicultura Rural. Red de Acuicultura Rural en Pequeña escala. Taller ARPE, FAO-UCT. Pp: 1-38.

- Blake S.L., Schill W.B., McAllister P.E., Lee M.K., Singer J.T., Nicholson B.L. 1995. Detection and Identification of Aquatic Birnaviruses by PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 33: 835-839.
- CONAPESCA (PRONALSA). 2000. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola. México D.F. Volumen II.
- CONAPESCA 2007. Normas Oficiales Pesqueras y Acuicolas.
- Dopazo C. P., Hetrick F.M., Samal S.K. 1994. Use a Cloned cDNA Probes for Diagnosis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Infections. *J. Fish. Dis.* 17:1-16.
- López-Lastra M., González M., Jashes M., Sandino A.M. 1994. A detection Method for Infectious Pancreatic necrosis Virus (IPNV) Based on Reverse Transcription (RT)-Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Fish. Dis.* 17:260-282.
- Moon C.H., Do J. W., Cha S. J., Bang J. D., Park M. A., Yoo D. J., Lee J. M., Kim H. G., Chung D. K., Park J. W. 2004. Comparixon of the Immunogenicity of Recombinant VP2 and VP3 of Infectious Pancreatic Necrosis Virus and Marine Birnavirus. *Archives of Virology.* 149: 2059-2068
- Organización Internacional de Epizootias. 2006. Manual para el Diagnóstico de Enfermedades en Animales Acuáticos. Parte 2. Sección 2.2. Capítulo 2.2.3.
- Ortega C., Montes de Oca R., Groman D., Yason C., Nicholson B., Blake S. 2002. Case Report: Viral Infectious Pancreatic Necrosis in Farmed Rainbow Trout from Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health.* 14:305-310.
- Rimstad E., Hornes E., Olskiv O., hyllseth B. 1990. Identification of a Double-Stranded RNA Virus by Using Polymerase Chain Reaction and Magnetic Separation of the Synthesized DNA Segments. *J. Clin. Microbiol.* 28:2275-2278.
- Rodríguez S., Borrego J., Pérez-Prieto S. 2001. Comparative Evaluation of a Five Serological Methods and RT-PCR Assay for the Detection of IPNV in Fish. *Journal of Virological Methods.* 97:23-31
- Rodríguez S., Vilas M.P., Alonso M., Pérez S.I. 1995. Study of a Viral-Dual Infection in Rainbow Trout (*Oncorhyncus mykiss*) by Seroneutralization, Western Blot and Polymerase Chain reaction Assays. *Microbiología.* 11:461-470.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SEMARNAP., PRONALSA. 1998. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola. México D.F. Volumen I. No. 1, 2 y 3.
- Taksdal E., Dannevig B., Rimstad E. 2001. Detection of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)-Virus in Experimentally Infected Atlantic Salmon Parr by RT-PCR and Cell Culture isolation. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 21:214-219.
- Valderrama-Cháirez M.L., Cruz-Hernández A., Paredes-López O. 2002. Isolation of Functional RNA from Cactus Fruti. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 20:279-286.
- Wang W.S., Wi Y.L., Lee J.S. 1997 Single-Tube, Non-Interrupted reverse Transcription PCR for Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Dis. Aquat. Org.* 28:229-233.