
DETECCIÓN DE BETANODAVIRUS EN MUESTRAS CLÍNICAS FRESCAS Y DESECADAS DE *Dicentrarchus labrax* MEDIANTE RT-qPCR

Soler-Ferrer P., Navas E., Sánchez A., Valls L., y Maldonado J.



La Referencia
en Prevención
para Salud Animal

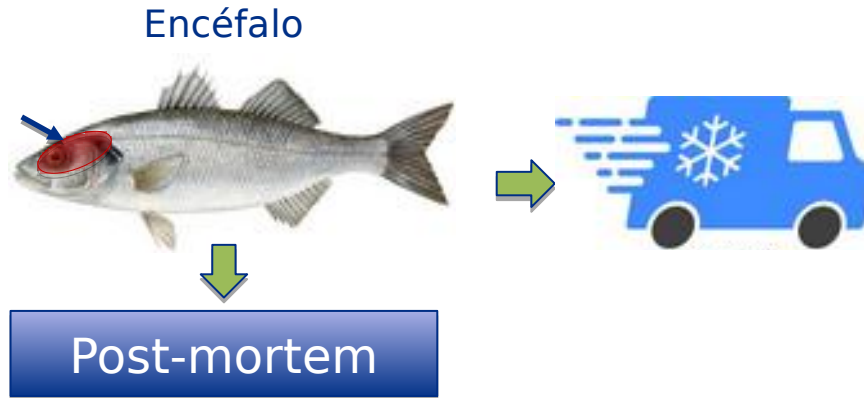


XXIV SIMPOSIO
2019

PAMPLONA

INTRODUCCIÓN

- Necrosis Nerviosa Viral (NNV).
- Afectación > 120 especies de peces (grandes pérdidas económicas).
- Limitaciones diagnóstico actual:



Muestras biológicas desecadas



Tarjetas FTA

- Inactivación
- Estable a Tº ambiente
- Envíos internacionales

Objetivos generales

1. Optimizar la detección de Betanodavirus (NNV) en lubina por RT-qPCR y **validar** un método de transporte alternativo (**FTA**) de muestras de encéfalo (*post-mortem*).
2. Utilizar los métodos validados con muestras de huevos (ante-mortem) y larvas de lubina.

Diseño experimental

FASE 1. Validación RT-qPCR



1.1
Especificidad

**1.2. Límite
detección**

1.3.
Eficiencia

FASE 2. Validación RT-qPCR en FTA



**2.1 Límite
detección**

2.2
**Muestras
clínicas**

2.3
**Estabilidad
ARN**

Material y métodos (Fase 1)

PCR: adaptada de Baud et al. 2015
(Gen: ARN1)

1.1 Especificidad

- Cepa referencia de betanodavirus (RG/RG con título $10^{10,06}$ DIC₅₀/ml)
- Panel de cepas víricas y bacterianas patógenas en acuicultura (n=18)
- GenBank

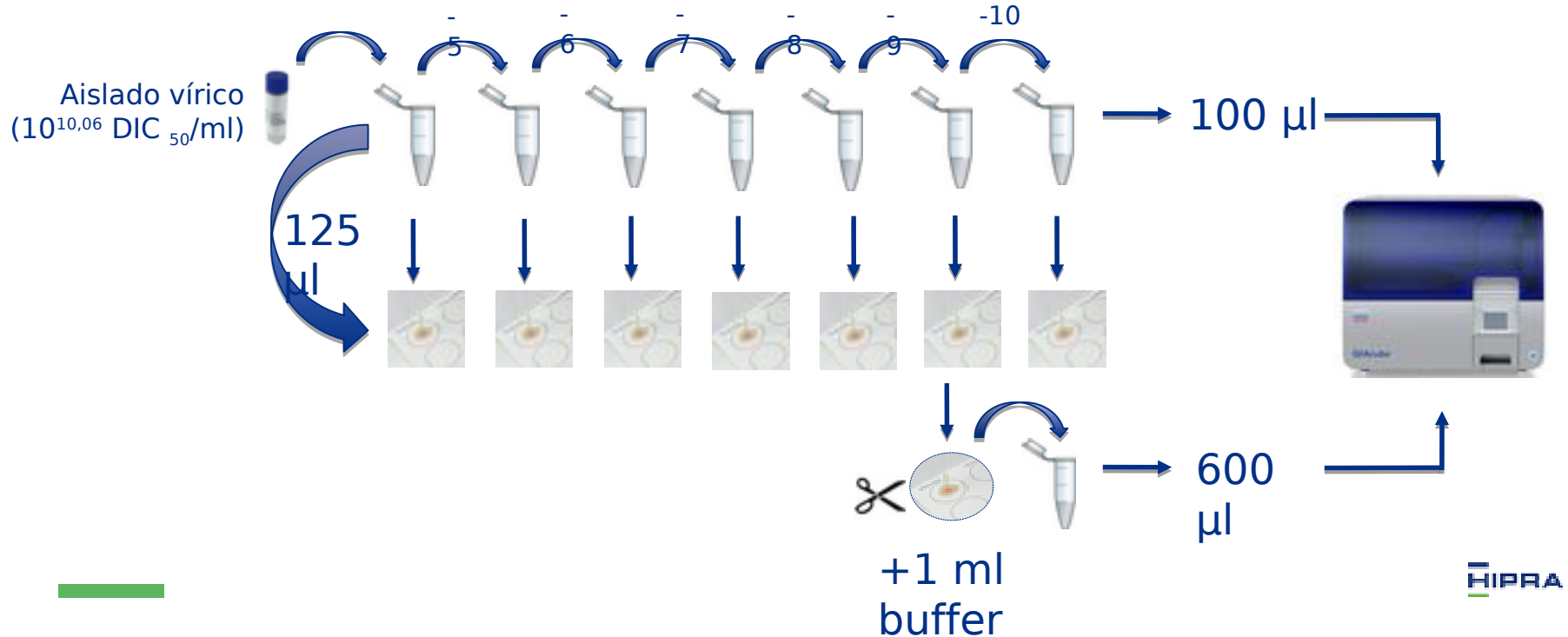
— Banco de diluciones en base 10

1.2 Límite detección

1.3 Eficiencia: 3 réplicas

Material y métodos (Fase 2)


2.1 Límite de detección:





Material y métodos (Fase 2)

2.3 Estabilidad:

	1 semana	2 semanas	4 semanas	8 semanas
Aislado vírico 				
				

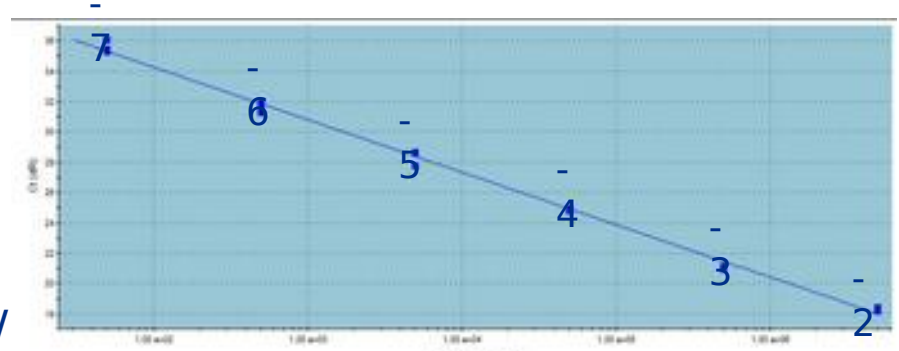
Resultados

FASE 1. Validación RT-qPCR

1.1 Especificidad: 100%

1.2 Límite de detección: $\left\{ \begin{array}{l} 10^{3,06} \text{ DIC}_{50}/\text{ml} \\ < 1,5 \text{ ng de ARN}/\mu\text{l} \end{array} \right.$

1.3 Eficiencia: 94,6%



✓ Y: -3,459

✓ R: 0,996

Valores de referencia

R2: 0,99

Y: -2,5/-4,3

Eficiencia >90%

Resultados

FASE 2. Validación RT-qPCR en

FTA

2. 1. Límite de detección en FTA (*positivo: Ct*
 $\leq 38,5$)

Dilución (aislado vírico)	Título (DIC ₅₀ /ml)	Resultado RT-qPCR (Ct)	
		Fresco	FTA
-4	10 ^{6,06}	24,2	29,5
-5	10 ^{5,06}	27,19	34,1
-6	10 ^{4,06}	30,9	35,7
-7	10^{3,06}	35,1	37,1
-8	10 ^{2,06}	neg	neg
-9	10 ^{1,06}	neg	neg
-10	10	neg	neg

Resultados

FASE 2. Validación RT-qPCR en

FTA Muestras clínicas de infección experimental:

Tipo muestras	Referencias	Fresco	FTA
Control	1-TANQUE A	neg	neg
	2-TANQUE A	34,5*	neg
	3-TANQUE A	36,3*	neg
	4-TANQUE A	neg	neg
	5-TANQUE A	neg	neg
Infectadas	1-TANQUE B	19,5	13,6
	2-TANQUE B	24,2	17,8
	3-TANQUE B	23,7	16,3
	4-TANQUE B	21,7	16,6
	5-TANQUE B	16,9	14,1
	6-TANQUE B	20,5	15,4
	7-TANQUE B	21,1	14,6
	8-TANQUE B	17,4	14,8



* posible contaminación en procesado.

Resultados

FASE 2. Validación RT-qPCR en

2.2.2 FTA "Spiked samples*" de huevas y larvas en fresco y FTA :



*Infección de

Muestra	Fresco	FTA
Larvas control	neg	neg
Larvas infectadas	18,62	19,28
Huevas control	neg	neg
Huevas infectadas	16,57	17,3



Resultados

FASE 2. Validación RT-qPCR

en FTA

2.3 Estudio de estabilidad en
FTA:

	Resultado RT-qPCR a lo largo del tiempo(Ct)			
	1 semana	2 semanas	4 semanas	8 semanas
Cepa de referencia 	11,6	11,2	12	12,08
Encéfalo 	18,07	23,5	21	21,2

Conclusiones

- ✓ El uso combinado de PCR y de tarjetas FTA permite confirmar la presencia de infección por NNV en lubina, facilitando el transporte de las muestras y contribuyendo a un mejor control de la enfermedad, aún en ausencia de mortalidad.
- ✓ La señal de la RT-qPCR muestra variaciones cuantitativas (Ct) al comparar los resultados en muestras frescas y desecadas, si bien estas variaciones no alteran el resultado cualitativo del ensayo (positivo o negativo).
- ✓ El ARN del NNV se mantiene estable en la FTA por un periodo de tiempo suficiente para su transporte de la piscifactoría al laboratorio.

Agradecimientos

