



ALLIANCE™

(<https://debug.globalseafood.org>).



Health &
Welfare

Detección electroquímica de WSSV con electrodo desechable

30 November 2020

By Kenshin Takemura, Ph.D. , Jun Satoh, Ph.D. , Jirayu Boonyakida, Ph.D. , Sungjo Park, Ph.D. , Ankan Dutta Chowdhury, Ph.D. and Enoch Y. Park, Ph.D.

Primera demostración exitosa de un método novedoso que reconoce el importante patógeno del camarón, el Virus del Síndrome de Mancha Blanca



Esta es la primera detección electroquímica exitosa del Virus del Síndrome de Mancha Blanca, uno de los patógenos más importantes del camarón cultivado, con un impacto global de miles de millones de dólares, utilizando un nuevo electrodo desechable. Foto de Fernando Huerta.

El Virus del Síndrome de Mancha Blanca (WSSV) infecta al camarón y causa la enfermedad de la mancha blanca (WSD), que se considera uno de los virus patógenos más letales y costosos en la industria del camarón cultivado a nivel mundial. La vacunación es siempre el método más útil para resolver cualquier infección viral, y ya se han reportado algunos intentos de inducir una respuesta inmune y proteger a los camarones de la infección por WSSV, pero los resultados de estos intentos de vacunación aún son pobres considerando su uso práctico. Para evitar el riesgo de WSD en el cultivo de camarones, es importante tener los medios para identificar rápidamente cualquier camarón infectado.

Los métodos actuales para detectar el WSSV se basan en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, un método ampliamente utilizado para hacer rápidamente de millones a miles de millones de copias de una muestra de ADN específica) mediante técnicas de ADN viral o ensayos de proteínas que utilizan un anticuerpo específico, con un límite de detección, LOD (la cantidad más baja de una sustancia que se puede distinguir de la ausencia de esa sustancia con un nivel de confianza generalmente del 99 por ciento) de unos pocos cientos de copias de ADN por ml dentro de cuatro a 12 horas. Los ensayos de diagnóstico por PCR para uso en acuicultura están limitados por su costo y la necesidad de operadores altamente capacitados. Otros métodos de detección de WSSV incluyen otras técnicas sofisticadas como dot blots, ensayo de flujo lateral y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Nanomateriales [materiales con una sola unidad de tamaño – en al menos una dimensión – entre 1 y 100 nanómetros (una unidad de longitud en el sistema métrico igual a una milmillonésima parte de un metro, o 0,000000001 metro)] con propiedades físicas, ópticas y electroquímicas únicas se han utilizado con éxito para la detección de alta sensibilidad de varios virus. La espectroscopia de

impedancia electroquímica (EIS) es una técnica sensible para el análisis de las propiedades y el reconocimiento de diversas reacciones moleculares, y mediante biosensores se pueden detectar directamente diversos eventos moleculares. Por ejemplo, hemos demostrado la detección del virus de la hepatitis E con un electrodo biosensor fabricado constituido por anticuerpos específicos y nanomateriales basados en un proceso impedimétrico diseñado por ingeniería.

Este artículo, adaptado y resumido del the **original** (<https://doi.org/10.1186/s12951-020-00712-4>). [Takemura, K. et al. 2020. Electrochemical detection of white spot syndrome virus with a silicone rubber disposable electrode composed of graphene quantum dots and gold nanoparticle-embedded polyaniline nanowires. *J Nanobiotechnol* 18, 152 (2020)] reporta sobre un electrodo desechable que puede detectar con precisión el WSSV y puede tener aplicaciones importantes en la industria acuícola.

Configuración de estudio

Para obtener información detallada sobre el proceso altamente técnico, el equipo y los materiales utilizados para fabricar el electrodo de prueba, incluida la deposición de nanocompuestos en el electrodo sensor, así como la recolección y el pretratamiento de WSSV, y la detección de WSSV utilizando el electrodo desechable, consulte el artículo original.

Resultados y discusión

El electrodo desechable que desarrollamos demostró durante sus pruebas una capacidad para detectar WSSV en un amplio rango lineal, con alta especificidad y sensibilidad. La estabilidad del sensor también se probó durante más de un mes para confirmar su aplicabilidad para la detección de virus in situ.

La gráfica de impedancia eléctrica (medida de la oposición que presenta un circuito a una corriente cuando se aplica un voltaje) del electrodo desechable después de la incubación de diferentes concentraciones del virus de 10^2 a 10^9 copias por ml se muestra en la Figura 1a. Las respuestas de los electrodos sensores aumentan con la concentración de WSSV debido a la acumulación de alta resistencia en el electrodo cargado de virus. Cuando el WSSV se une al electrodo sensor, una gran cantidad de partículas de virus no conductoras cubren la superficie conductora, aumentando la resistencia.

El gráfico de calibración muestra una excelente relación lineal entre la resistencia y la concentración de WSSV (Fig. 1b). Se determinó que el límite de detección, LOD, era tan bajo como 48,4 copias por ml, un valor extremadamente bajo y sensible con un uso práctico. Después de la detección de WSSV, la superficie del electrodo cargado de virus mostró una rugosidad significativamente mayor, lo que indica la presencia de WSSV en el electrodo.

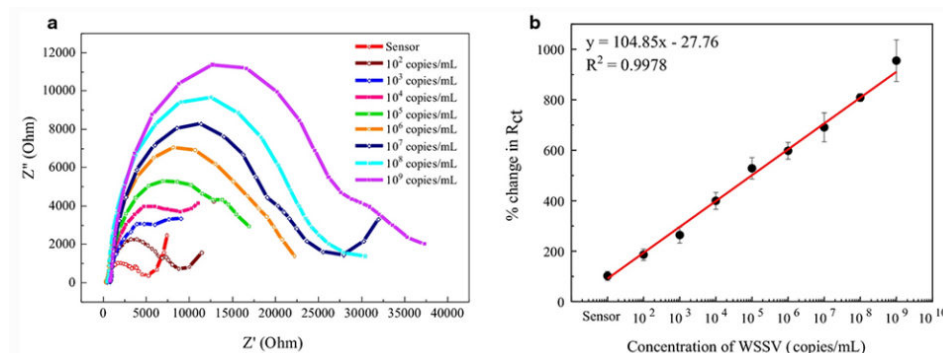


Fig. 1: Detección de WSSV utilizando el electrodo desechable. (a) Gráficos de resistencia para diferentes concentraciones de WSSV. Valores de eje en ohmios, unidades utilizadas para medir la resistencia eléctrica. (b) Curva de calibración de la impedancia correspondiente. El valor de resistencia de carga (R_{ct}) es una medida relevante para la electroquímica de corrosión y las reacciones electroquímicas. Cada detección se realizó tres veces y los datos se dan como promedio \pm DE ($n = 3$).

Comparamos nuestro rendimiento de detección con varios otros métodos de detección de WSSV. Muchos estudios han detectado ADN con éxito, pero no es fácil implementar una detección rápida e in situ debido a la necesidad de extraer ADN del WSSV. Nuestro sistema de detección es práctico porque muestra una alta sensibilidad, simplicidad y adaptabilidad para la detección en el sitio.

Con respecto a la selectividad y estabilidad del electrodo desechable, y para confirmar la especificidad hacia WSSV, también se probaron varios otros virus y algunos materiales durante nuestro estudio con el electrodo sensor. Las respuestas del sensor (excepto para WSSV, Fig. 2a), fueron similares a las del electrodo desnudo, lo que indica la especificidad del sensor para el virus objetivo. La alta selectividad de los sensores se logró mediante su recubrimiento especial con diversos materiales y su limpieza eficaz. Cuando estaban presentes muchas sustancias extrañas y se producía una adsorción no específica en la superficie del sensor, las sustancias distintas del WSSV objetivo se eliminaron con una solución de lavado de alta eficacia, lo que dio como resultado la alta selectividad de nuestro método de detección.

La estabilidad del electrodo desechable se probó durante ocho semanas para observar su aplicabilidad para un uso a largo plazo. Como se muestra en la Fig. 2b, la intensidad de la señal después de la carga de 10^4 copias por ml del virus permaneció al 86 por ciento hasta el día 35. Sin embargo, descendió al 73,4 por ciento después de 56 días de almacenamiento debido a la degradación del anticuerpo utilizado.

Fig. 2: (a) Prueba de selectividad del recubrimiento del electrodo utilizado para la detección de WSSV en comparación con virus no objetivo y varios iones y otras sustancias. (b) Prueba de estabilidad del electrodo desechable. El electrodo se almacenó en el refrigerador

durante 56 días y el rendimiento de detección se probó cada semana a partir de la segunda semana. Adaptado del original.

Después de la detección exitosa de WSSV en un medio buffer, se recolectaron muestras de virus de 10 camarones infectados con WSSV y se analizaron. Sus números de copias de ADN se compararon con los resultados obtenidos con esta técnica de detección electroquímica. La tendencia general de los resultados de la PCR para las muestras mostró una similitud sobresaliente con la tendencia de los resultados del sensor electroquímico, lo que confirma la reproducibilidad de los resultados del sensor. En general, nuestros datos muestran que nuestro sistema de detección tiene una sensibilidad más alta, de seis a siete órdenes de magnitud, que otras técnicas de prueba actualmente utilizadas para el WSSV como el western blot, y puede detectar el WSSV de animales infectados en menos de 20 minutos.

Perspectivas

Desarrollamos y validamos un electrodo desechable para la detección rápida y sensible del Virus del Síndrome de Mancha Blanca (WSSV) en 20 minutos. Durante las pruebas, nuestro sensor detectó el virus en un amplio rango lineal de 10^2 a 10^9 copias de ADN por ml, con un límite de detección de 48,4 copias por ml. Y se demostró con éxito que la funcionalidad del electrodo desechable tiene una alta selectividad y estabilidad a largo plazo durante aproximadamente cinco semanas.

La capacidad de detección también se probó con éxito para otros virus, lo que sugiere su aplicabilidad versátil para uso futuro. El sensor se aplicó para detectar el virus de camarones cultivados infectados con WSSV y se encontró que era comparable con el análisis de PCR utilizado actualmente, lo que confirmó su aplicabilidad como un excelente sistema de monitoreo para la detección de virus en tiempo real.

Esta es la primera demostración de la detección de WSSV por un electrodo sensor nanofabricado con alta sensibilidad, selectividad y estabilidad, lo que sugiere su potencial como herramienta de diagnóstico para monitorear WSSV en la industria acuícola. Este sistema de detección podría desempeñar un papel importante en el control de la propagación del WSSV para los sistemas de detección in situ en las instalaciones de producción de camarón.

Authors



KENSHIN TAKEMURA, PH.D.

Laboratory of Biotechnology
Department of Bioscience
Graduate School of Science and Technology
Shizuoka University
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan

**JUN SATOH, PH.D.**

Division of Pathology, Department of Aquaculture Research
Fisheries Technology Institute of Japan
Fisheries Research and Education Agency
National Research and Development Agency
Tamaki Field Station
224-1 Hiruta, Tamaki, Watarai, Mie, 519-0423, Japan

**JIRAYU BOONYAKIDA, PH.D.**

Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience
Graduate School of Science and Technology
Shizuoka University
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan

**SUNGJO PARK, PH.D.**

Division of Cardiovascular Diseases
Mayo Clinic College of Medicine and Science
Mayo Clinic
200 First Street SW, Rochester, MN, 55905 USA

**ANKAN DUTTA CHOWDHURY, PH.D.**

Laboratory of Biotechnology
Research Institute of Green Science and Technology
Shizuoka University
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan



ENOCH Y. PARK, PH.D.

Corresponding author
Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience
Graduate School of Science and Technology
Shizuoka University
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan

park.enoch@shizuoka.ac.jp (<mailto:park.enoch@shizuoka.ac.jp>).

Copyright © 2023 Global Seafood Alliance

All rights reserved.