



ALLIANCE™

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



Health &
Welfare

La prueba de PCR de muestras de un solo tejido puede dar lugar a datos erróneos

17 September 2018

By Tansyn H. Noble , Christopher N. Stratford , Nick M. Wade, Ph.D. , Jeff A. Cowley, Ph.D. , Melony J. Sellars, Ph.D. , Greg J. Coman, Ph.D. and Dean R. Jerry, Ph.D.

Un estudio australiano analiza las cargas de infección del virus asociado a las branquias (GAV) en el camarón



La autora principal Tansyn Noble y Quyen Q. Banh toman muestras de tejido branquial de camarones.

El mayor riesgo para la viabilidad y la expansión de la industria mundial del cultivo del camarón es la enfermedad, que se estima causa pérdidas anuales de producción que superan los \$ 3 mil millones. Por lo tanto, el manejo apropiado de la enfermedad es crítico para minimizar estas pérdidas. Actualmente, el principal método para controlar los riesgos de enfermedades implica el uso de líneas de reproducción libres de patógenos (SPF) o resistentes/tolerantes (SPR/T) para producir semillas de alta salud en combinación con robusta bioseguridad y saneamiento.

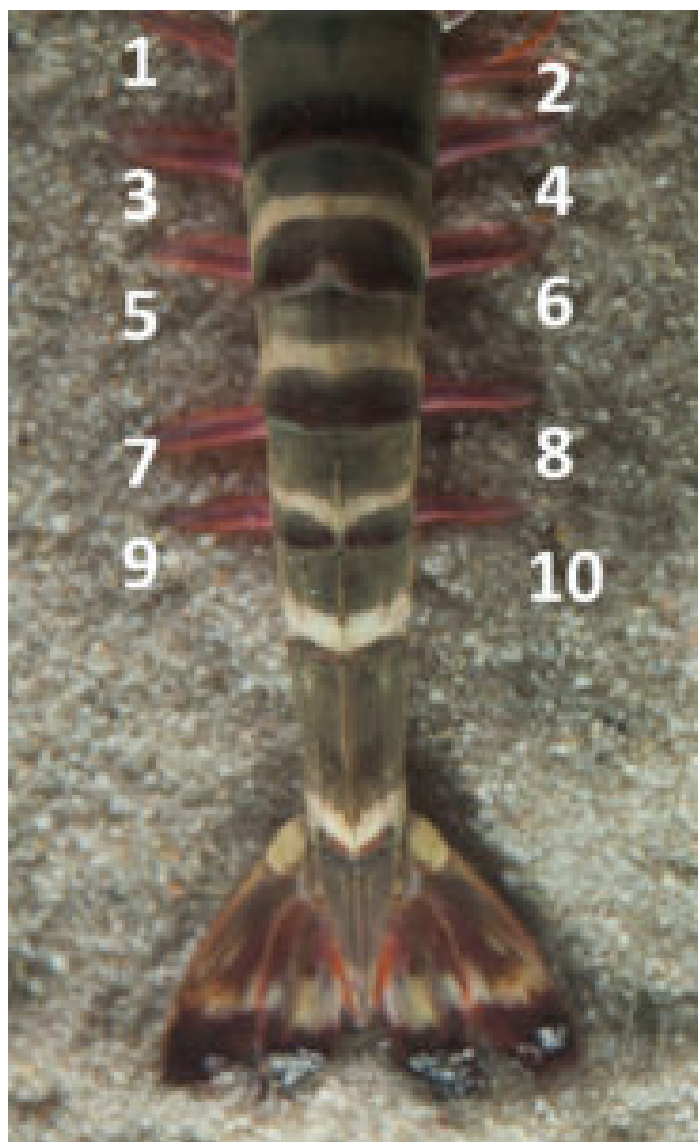
Estas estrategias dependen en gran medida del acceso a métodos de detección de patógenos precisos, rápidos y sensibles, como las pruebas de PCR cuantitativa convencional y en tiempo real (qPCR), y existen muchas pruebas de PCR desarrolladas para detectar todos los principales patógenos del camarón. En los casos en que se requieren pruebas no destructivas, como la selección de reproductores de camarones para determinar la presencia de un virus y la carga de infecciones, muestras de branquias, pleópodos o hemolinfa son las únicas fuentes prácticas de tejido para las pruebas.

El virus asociado a las branquias (GAV), también conocido como genotipo 2 del virus de la cabeza amarilla (YHV2), está muy extendido en el camarón tigre negro silvestre y cultivado australiano (*Penaeus monodon*). En Australia existe un interés creciente por establecer poblaciones reproductoras de *P. monodon* que sean SPF y/o SPR/T para GAV. Ambos requieren una detección y cuantificación precisas de las cargas de infección por GAV, y el tejido branquial o pleópodo se ha usado comúnmente para el análisis de RT-PCR. Sin embargo, la medida en que las cargas de GAV pueden variar entre diferentes filamentos de branquias, o pleópodos, muestreados del mismo camarón es mayormente indeterminado.

Este artículo resume los resultados de un **estudio** (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.028>) que utilizó análisis RT-qPCR para cuantificar con precisión las cargas de infección por GAV en diferentes filamentos branquiales y pleópodos muestreados de individuos de *P. monodon* con infecciones adquiridas naturalmente, para comparar la sensibilidad y la variabilidad dentro de cualquier tipo de tejido. Para entender cómo GAV puede variar

en situaciones en las que se encontrarán infecciones naturales, en lugar de infecciones artificiales, como la detección de camarones en estanques de la granja o reproductores capturados en el medio silvestre, utilizamos animales infectados naturalmente. También se tomaron muestras de ambos lóbulos de órganos linfoides de un subconjunto de *P. monodon* adulto para comparar la sensibilidad de detección de GAV en las branquias y el tejido de pleópodos, en comparación con el órgano linfoide, que es el tejido objetivo recomendado para GAV.

La autora principal fue apoyada por una beca del Programa de Capacitación en Investigación del Gobierno de Australia, y el financiamiento para este trabajo se originó en el Programa de Investigación de Transformación Industrial del Consejo Australiano de Investigación IH130200013.



Pleópodos muestreados para la detección de GAV.

Configuración del estudio

Muestreamos tejidos de dos grupos independientes de *P. monodon* criados en el Bribie Island Research Centre (BIRC), Queensland, Australia. El grupo 1 incluyó 10 juveniles (peso promedio 10.9 ± 1.4 gramos), y cada camarón tuvo ocho filamentos de branquias y ocho pleópodos muestreados. El grupo 2 tenía 12 animales adultos (peso promedio 40.4 ± 2.3 gramos) y cada camarón tuvo 10 filamentos, 10 pleópodos y ambos lóbulos de órganos linfoides muestreados. Los tejidos se conservaron hasta que se procesaron.

Para descripciones detalladas de los procedimientos de extracción de ARN, síntesis de cADN y qPCR en tiempo real; y análisis estadísticos, consulte la publicación original o el primer autor.

El coeficiente de variación (CV) se utilizó para determinar si las branquias o el tejido de pleópodos difirieron en el nivel de variabilidad en las cargas de infección por GAV detectadas entre los filamentos branquiales individuales y los pleópodos muestreados de cada camarón.

Resultados y discusión

El manejo de diversas enfermedades que afectan al camarón cultivado depende de métodos confiables y precisos para detectar y cuantificar las infecciones por patógenos. Nuestro estudio utilizó métodos RT-qPCR para cuantificar y comparar las cargas de infección por GAV entre filamentos de branquias, pleópodos y lóbulos de órganos linfoides individuales muestreados de camarón tigre negro infectado naturalmente con GAV.

La precisión de las réplicas técnicas fue generalmente alta, a excepción de algunas muestras con cargas de infección por GAV muy bajas y con valores de desviación estándar más variables. La precisión reducida puede afectar la precisión de la detección y cuantificación de la infección por GAV, y se anticipa porque los números de plantilla de ARN GAV en cada reacción se aproximan al límite de sensibilidad de detección de la prueba RT-qPCR.

Las cargas de infección por GAV detectadas en filamentos y/o pleópodos individuales muestreados de cada camarón frecuentemente variaban en más de 10 veces, y en algunos camarones hasta en aproximadamente 3.000 veces. La escala de variabilidad fue evidente en ambos grupos de *P. monodon* independientemente de la gravedad de la infección por GAV. Se ha reconocido una variabilidad similar de carga de infección, incluidos falsos negativos, entre los pleópodos muestreados de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) infectados a niveles bajos con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y posiblemente con otros patógenos del camarón.

Nuestros resultados enfatizan la posibilidad de que se pasen por alto las infecciones de patógenos cuando se utilizan muestras de un solo tejido, especialmente en camarones con infecciones naturales de bajo nivel. Es difícil predecir el número mínimo requerido de muestras de filamento branquial o de pleópodos, pero basado en el camarón juvenil en este estudio como ejemplo, el número mínimo de filamentos de branquias o muestras de pleópodos que se habría requerido para obtener una prevalencia del 100 por ciento fue de cinco y siete, respectivamente. En el camarón adulto, una sola muestra de tejido habría sido suficiente si todas las muestras dieron positivo, enfatizando la especificidad de un número mínimo de muestra para los grupos que se están evaluando.



Tejido de agallas muestreado para detección de GAV.

Los diagnósticos erróneos de infección pueden tener graves consecuencias en los programas de cría de camarón tigre negro, donde los reproductores silvestres generalmente se seleccionan para la cría con base en su análisis PCR negativo para patógenos específicos (libre de patógeno específico o SPF). Nuestros datos muestran que la prueba de un único filamento de branquias o de pleópodo podría aumentar el riesgo de una infección falsa negativa e incumplida, lo que daría como resultado la posible transmisión vertical del patógeno a semillas y luego a estanques de cultivo u otros reproductores SPF.

Para los reproductores, puede ser más apropiado realizar múltiples pruebas sucesivas de PCR, preferiblemente utilizando grupos de más de una muestra de tejido, durante la cuarentena de reproductores silvestres antes de que se seleccionen para el uso en programas de mejoramiento SPF. O, como alternativa, aumentar la cantidad de camarones evaluados para aumentar la precisión de las estimaciones de prevalencia cuando se evalúa a nivel de población.

La gran variabilidad en las cargas de infección por GAV entre filamentos branquiales individuales o de pleópodos en algunos camarones, además de posibles detecciones negativas falsas, puede producir datos inexactos sobre las cargas de infección y puede minimizar la gravedad de la infección cuando se muestrea un único filamento branquial o pleópodo. Esto podría afectar la precisión de las comparaciones relativas entre camarón individual, ya que sin datos precisos sobre la carga de infección de patógenos de un individuo, la capacidad de estimar con confianza las contribuciones genéticas a la variación entre individuos o líneas familiares se verá seriamente desfavorecida.

Las cargas de infección por GAV cuantificadas en cada uno de los lóbulos de órganos linfoides del camarón adulto del Grupo 2 fueron claramente más altas (435 a 856 veces) y variaron mucho menos en comparación con las detectadas entre los pleópodos o los filamentos branquiales del mismo camarón, lo que es consistente con análisis previos de *P. monodon* infectado por GAV que encontró niveles más altos de GAV en el órgano linfoide.

A pesar de que el órgano linfoide es la muestra de tejido óptimo para la sensibilidad de detección para GAV, hay casos en que el muestreo de este órgano no es apropiado, ya que requiere sacrificar al animal (generalmente no es una opción en situaciones de cría de camarones), es difícil de muestrear en animales pequeños y puede ser agotador localizar y diseccionar durante el chequeo de alto rendimiento. Por lo tanto, los tejidos alternativos como las branquias y los pleópodos se utilizan a menudo, ya que se pueden tomar muestras de forma no destructiva y eficiente en la mayoría de los escenarios.

Por lo tanto, nuestros datos sugieren que ninguno de los tejidos es más ventajoso para producir datos exactos de carga de infección por GAV, por lo que la decisión sobre qué tipo de tejido (pleópodo o agalla) se tomará dependerá de la forma más apropiada para la recolección y los procedimientos de laboratorio. Pueden existir diferencias en la cantidad de ARN total aislado por μg de tejido y afectar las comparaciones relativas realizadas entre los tipos de tejidos.

Perspectivas

Los resultados de nuestro estudio sobre camarones con infecciones por GAV adquiridas naturalmente demostraron que las cargas de infección podrían diferir considerablemente entre los diferentes filamentos branquiales y pleópodos muestreados del mismo camarón. En consecuencia, las pruebas de una sola muestra de estos tejidos pueden subestimar la gravedad de la infección o incluso dar como resultado un diagnóstico erróneo de un animal infectado.

Cuando no es posible el muestreo del órgano linfoide, se recomienda la prueba de grupos de tejido de dos o más filamentos/pleópodos branquiales para rodear esta variabilidad y generar datos más precisos sobre la presencia y la gravedad de la infección por GAV.

Referencias disponibles del primer autor.

Authors



TANSYN H. NOBLE

Australian Research Council Industrial Transformation Hub for Advanced Prawn Breeding
James Cook University
Townsville, QLD 4811 Australia
and
College of Science and Engineering
James Cook Drive, Townsville, QLD 4811 Australia
and
CSIRO Agriculture & Food, Integrated Sustainable Aquaculture Production Program
Queensland Bioscience Precinct
306 Carmody Road, St Lucia, QLD 4067 Australia

tansyn.noble@csiro.au (<mailto:tansyn.noble@csiro.au>).



CHRISTOPHER N. STRATFORD

Australian Research Council Industrial Transformation Hub for Advanced Prawn Breeding
James Cook University
Townsville, QLD 4811, Australia
and
James Cook University
College of Science and Engineering
James Cook Drive, Townsville, QLD 4811, Australia
and
CSIRO Agriculture & Food, Integrated Sustainable Aquaculture Production Program
Queensland Bioscience Precinct
306 Carmody Road, St Lucia, QLD 4067, Australia



NICK M. WADE, PH.D.

Australian Research Council Industrial Transformation Hub for Advanced Prawn Breeding
James Cook University
Townsville, QLD 4811 Australia
and
CSIRO Agriculture & Food, Integrated Sustainable Aquaculture Production Program
Queensland Bioscience Precinct
306 Carmody Road, St Lucia, QLD 4067, Australia

**JEFF A. COWLEY, PH.D.**

Australian Research Council Industrial Transformation Hub for Advanced Prawn Breeding, James
Cook University, Townsville, QLD 4811, Australia
and
CSIRO Agriculture & Food, Integrated Sustainable Aquaculture Production Program
Queensland Bioscience Precinct
306 Carmody Road, St Lucia, QLD 4067, Australia

**MELONY J. SELLARS, PH.D.**

Australian Research Council Industrial Transformation Hub for Advanced Prawn Breeding
James Cook University
Townsville, QLD 4811 Australia
and
CSIRO Agriculture & Food, Integrated Sustainable Aquaculture Production Program
Queensland Bioscience Precinct
306 Carmody Road, St Lucia, QLD 4067, Australia

**GREG J. COMAN, PH.D.**

Australian Research Council Industrial Transformation Hub for Advanced Prawn Breeding
James Cook University
Townsville, QLD 4811 Australia
and
CSIRO Agriculture & Food, Integrated Sustainable Aquaculture Production Program
Queensland Bioscience Precinct
306 Carmody Road, St Lucia, QLD 4067, Australia



DEAN R. JERRY, PH.D.

Australian Research Council Industrial Transformation Hub for Advanced Prawn Breeding
James Cook University
Townsville, QLD 4811 Australia
and
James Cook University, College of Science and Engineering
James Cook Drive, Townsville, QLD 4811, Australia

Copyright © 2023 Global Seafood Alliance

All rights reserved.