

## Curso de Capacitación

“ Doce (12) puntos de verificación para la vigilancia de enfermedades en organismos acuáticos: una nueva aproximación para asistir equipos multidisciplinarios en países en desarrollo ”



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



# Lista de chequeo 6

## NIVEL III

## Análisis molecular

**Claudia Calderón**

Bacterióloga, MSc Microbiología

Responsable Laboratorio Biología Molecular

Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario ICA

## NIVEL III – ANÁLISIS MOLECULAR

Se llega al **NIVEL III** de diagnóstico (análisis molecular) **únicamente si el NIVEL I y II son compatibles con enfermedad por TiLV**



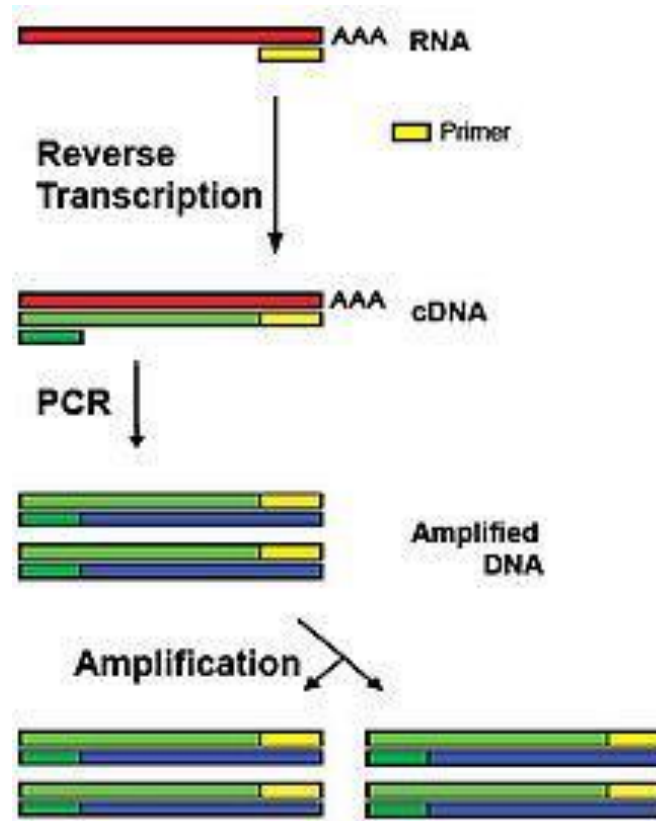
# LISTA DE CHEQUEO 6. PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO NIVEL III – ANÁLISIS MOLECULAR

## RT-PCR convencional

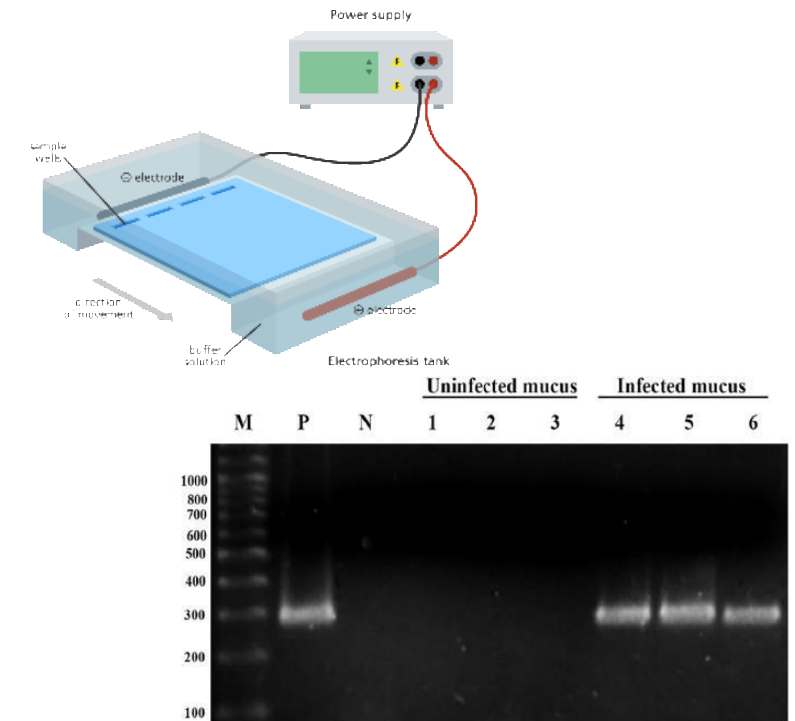
Transcripción reversa + Reacción en cadena de la polimerasa



Termociclador



## Electroforesis en gel de agarosa



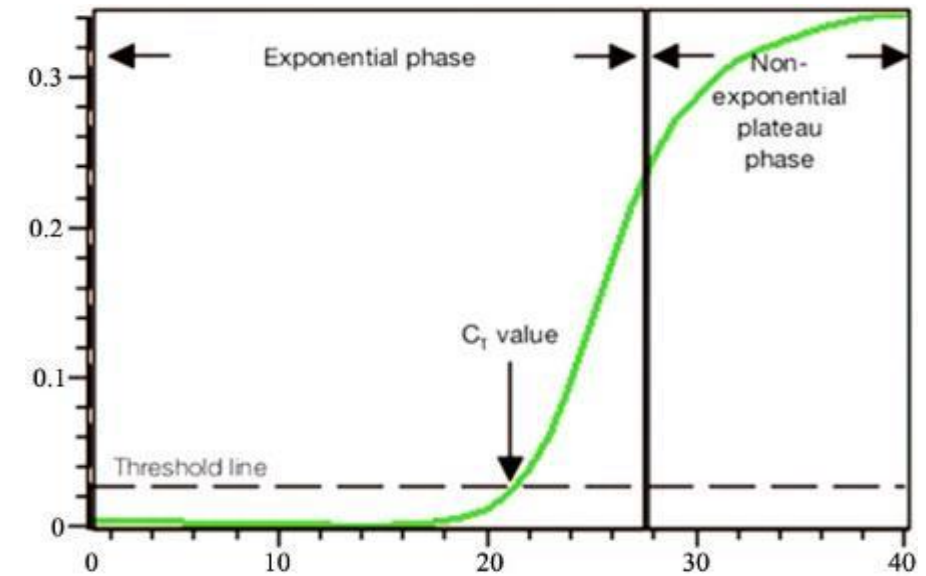
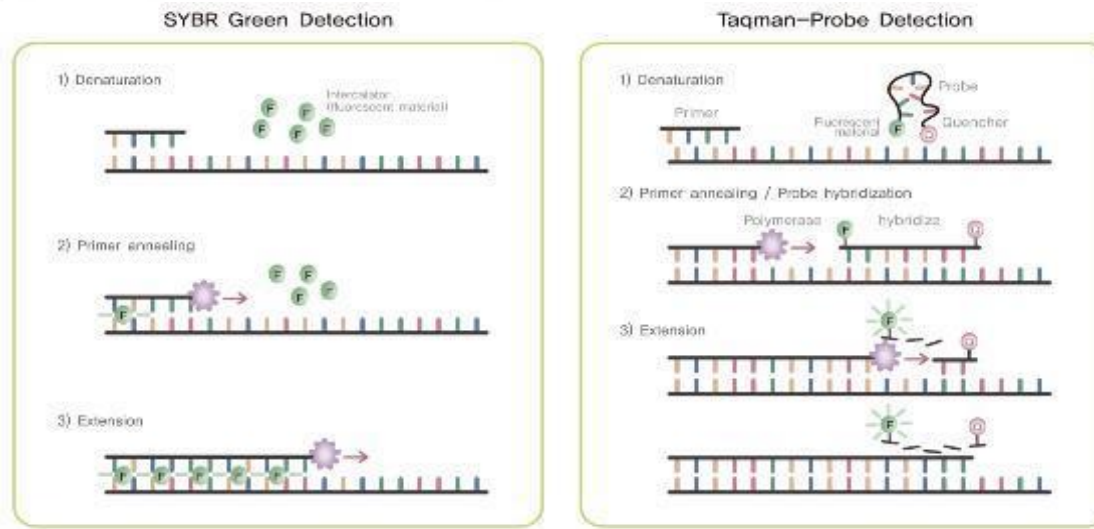
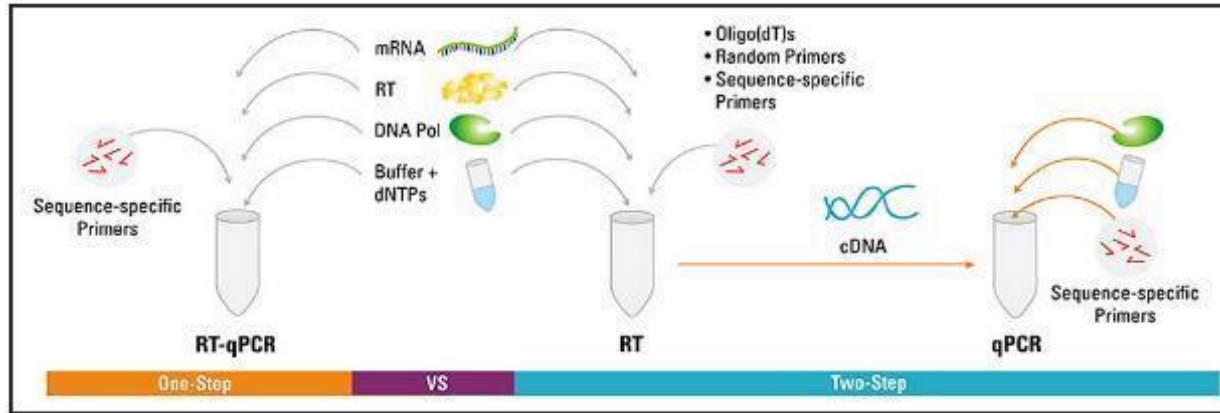
nd Diagnostics

# qRT-PCR

## Cuantitativo (tiempo real)

Transcripción reversa + Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo

# NIVEL III ANÁLISIS MOLECULAR



Traducción al español de la presentación original de Win Surachetpong y Kathy Tang-Nelson en el curso de entrenamiento EUS/TiLV Surveillance and diagnostics, Zambia, 2019

# LISTA DE CHEQUEO 6. PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

## NIVEL III – ANÁLISIS MOLECULAR

### LAMP

Amplificación isotérmica mediada por LOOP

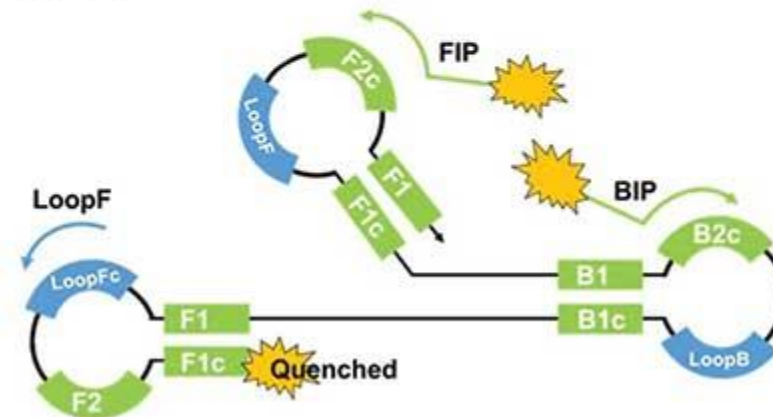
- LAMP requiere de 4 a 6 primers
- Uso de ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena.
- No requiere el paso de PCR para denaturalizar (90°C)
- La reacción ocurre a una misma temperatura 60°C
- Mayor tolerancia a inhibidores

Detección por Bioluminiscencia

#### LAMP amplification initiation

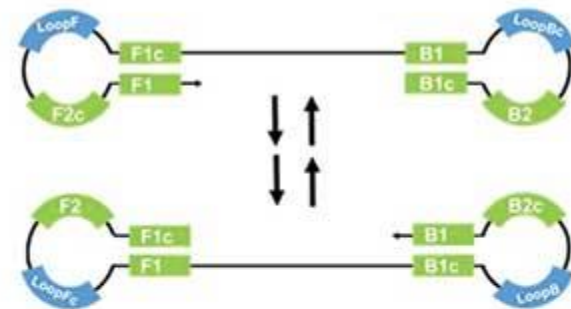


#### LAMP elongation



<https://thebiologynotes.com/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp/>

#### LAMP cycling



- ✓ Mayor sensibilidad y especificidad que PCR
- ✓ Económico
- ✓ Simple
- ✓ Sin termociclador



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



Instituto Colombiano Agropecuario

# LISTA DE CHEQUEO 6. PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

## NIVEL III – ANÁLISIS MOLECULAR



*VIRUS DE LA TILAPIA DE LAGO (TiLV)  
-UN NUEVO VIRUS DE TIPO ORTHOMYXO*

*Según la OIE, la RT-PCR se encuentra dentro de los métodos de prueba confirmatorios*

- RT-PCR Convencional. Eyngor et al., 2014
- RT PCR Anidada. Tsofack et al., 2016.
- RT-PCR semi-anidada. **Dong et., 2017.**
- PCR en tiempo real. **Tattiyapong et al. 2017.**

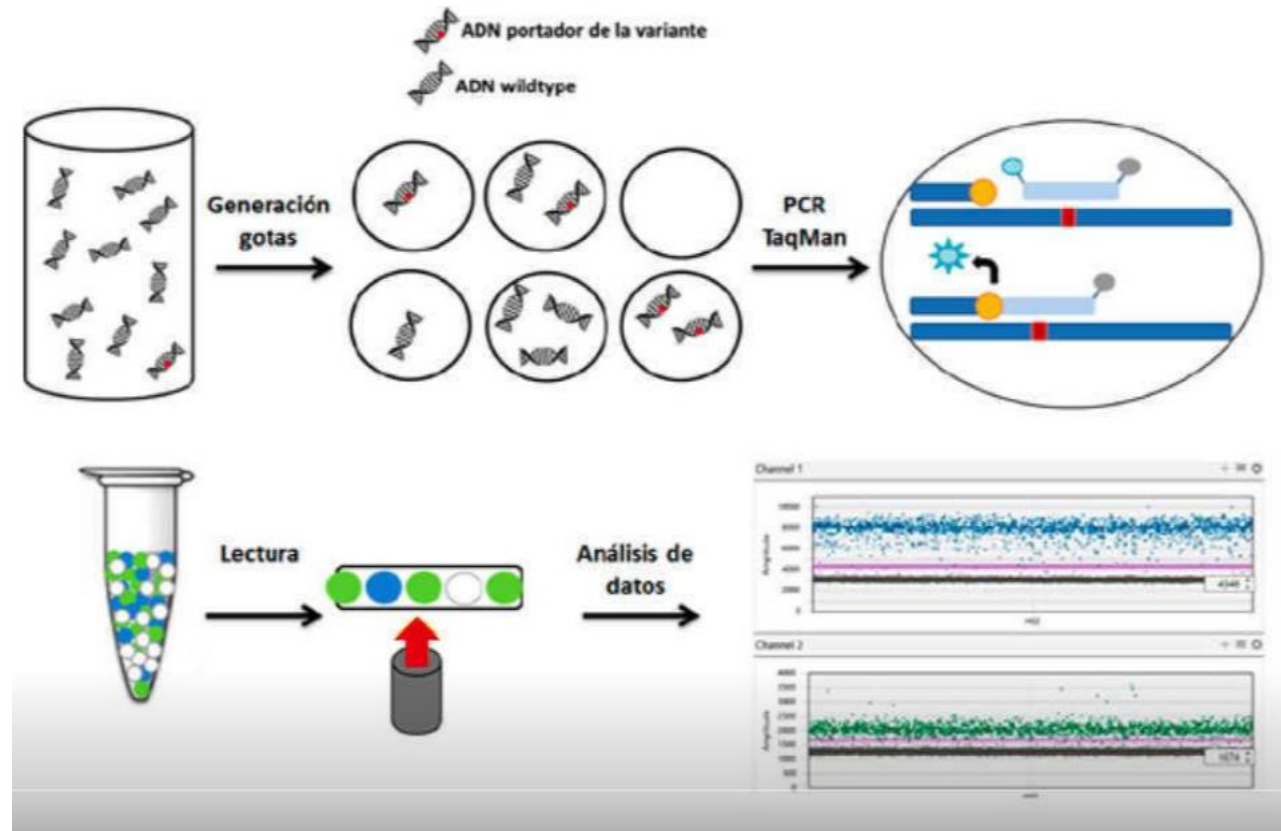
# LISTA DE CHEQUEO 6. PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

## NIVEL III – ANÁLISIS MOLECULAR

### iiPCR

PCR Digital

- Generación de gotas en la que se distribuirán las moléculas aleatoriamente.
- Pareja de sondas TaqMan (secuencia mutada).



DOI: 10.1016/j.rmcl.2017.06.002

Detección por Citometría de flujo

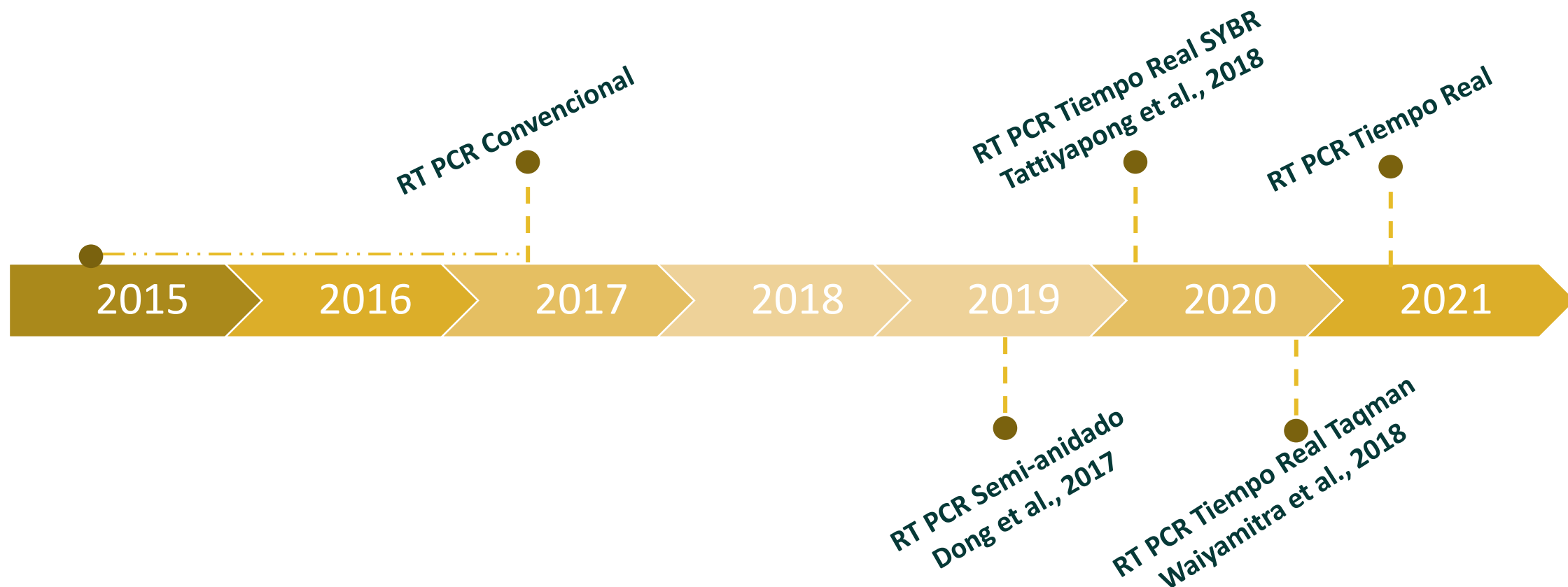


Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



Instituto Colombiano Agropecuario

# TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE TiLV EN EL LNDV



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



Instituto Colombiano Agropecuario



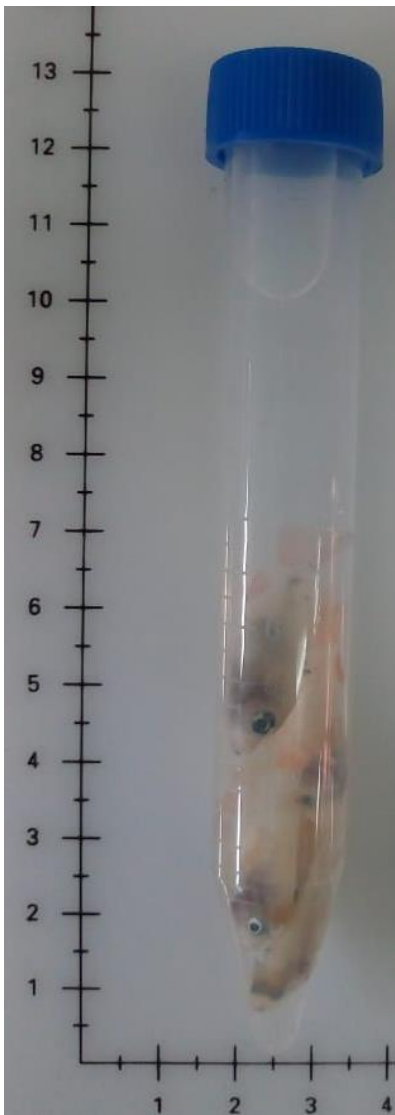
# DIFERENCIAS ENTRE LAS TÉCNICAS DESARROLLADAS DE RT-PCR

Characteristic	PCR method								
	Nested RT-PCR		Semi-nested RT-PCR(1)		Semi-nested RT-PCR(2)		RT-PCR	SYBR RT-qPCR	TaqMan RT-qPCR
Segment target	3		3		1		2	3	3
Product size (bp)	250, 491		250, 415		274, 620		834	112	93
Reference(s)	Tsofack et al., 2016		Dong et al., 2017		Taengphu et al., 2020		Mugimba et al., 2018	Tattiyapong et al., 2018	Waiyamitra et al., 2018
Primer name	Nested ext-2	ME1	ME1	ME1	TiLV/nSeg1F	TiLV/nSeg1F	Segment 2 FWD	TiLV-112F	TiLV-93F
	Nested ext-1	clone 7450/150R/ME2	Nested ext-1	clone 7450/150R/ME2	TiLV/nSeg1R	TiLV/nSeg1RN	Segment 2 REV	TiLV-112R	TiLV-93R

- Alta sensibilidad y especificidad para la detección de TiLV.
- RT-qPCR mayor sensibilidad.
- Todos los métodos tienen 100% de especificidad

Methods	No. negative/	No. positive/	Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Total number	Total number		
Nested RT-PCR	20/20	20/20	100	100
Semi nested RT-PCR(1)	20/20	20/20	100	100
Semi nested RT-PCR(2)	20/20	18/20	90	100
RT-PCR	20/20	13/20	65	100
SYBR RT-qPCR	20/20	20/20	100	100
TaqMan RT-qPCR	20/20	20/20	100	100

# POOL DE MUESTRAS PARA LA DETECCIÓN DE TiLV



## ¿Por qué?

- Probar peces individuales para TiLV requiere muestras de gran tamaño cuando la prevalencia dentro de la explotación es baja. Es costoso, requiere mucho tiempo y requiere mucha mano de obra.

## Ventajas

- Permite estimación de la prevalencia dentro de la granja.
- Estrategia dentro de la vigilancia posterior a brote de TiLV.



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



Instituto Colombiano Agropecuario

# POOL DE MUESTRAS PARA LA DETECCIÓN DE TiLV

No.	Pool Ct	No. infected fish per pool	Ct of individual positive(s) from a pool				
1	15.11	1	10.29	11.05	30.41	28.53	27.80
2	17.10	1	15.29	28.26	28.63	16.69	13.78
3	17.26	1	18.24	15.94	30.41	28.53	13.78
4	18.03	1	28.68	28.14	15.94	28.37	15.57
5	19.67	1	30.94	24.35	28.14	28.63	15.57
6	14.09	2	11.61	12.13	11.05	16.69	28.53
7	14.28	2	11.92	11.15	28.63	13.78	15.57
8	14.68	2	12.03	12.09	28.63	30.41	15.57
9	14.76	2	11.37	11.14	28.26	15.94	13.78
10	17.20	2	12.53	13.64	24.35	28.14	28.37

Doi: 10.1111/TBED.13957

- Un pool de tejidos de 5 o 10 peces individuales. que contenía al menos una muestra TiLV positiva fue suficiente para producir un resultado positivo.
- Excepto cuando los valores del umbral del ciclo (Ct) estaban entre 31 y el valor de corte de 34.

- Un modelo bayesiano mostró que la prevalencia dentro de la granja se puede estimar a partir del porcentaje de pooles positivos de 5.

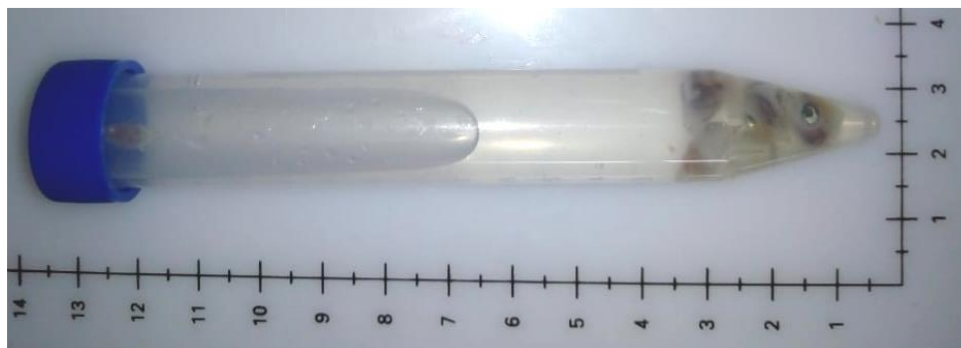
# ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINARIO (LNDV)



- **Tipo de muestra**

- Alevinos < a 2gramos

- Pool de órganos: hígado, riñón, encéfalo



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



# ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINARIO (LNDV)



- **Tipo de muestra**
  - Alevinos < a 2gramos
    - Con abdomen abierto completo



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



# ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINARIO (LNDV)

- Condiciones para la toma de la muestra y su conservación
- Uso de RNAlater<sup>®</sup> :
  - Solución para estabilización y protección del ARN
  - No altera la estructura tisular.
  - Almacenaje de las muestras inmersas en RNAlater a temperatura ambiente por una semana, sin comprometer calidad ARN.





Short communication

Effects of sample preservation and storage times on the detection of tilapia lake virus (TiLV) RNA in tilapia tissues

Pattarasuda Rawiwan<sup>a,b</sup>, Matepiya Khemthong<sup>a</sup>, Puntanat Tattiyapong<sup>a</sup>, David Huchzermeyer<sup>c</sup>, Win Surachetpong<sup>a,b,\*</sup>

## Comparación de métodos de conservación de RNA para detección de TiLV

RNA Later

2

Etanol 95%

Etanol 70%

Congelación -20°C

Refrigeración 4°C

Day (s)	TiLV copies/ $\mu\text{g}$ of total RNA				
	4 °C	-20 °C	70% ethanol	95% ethanol	RNAlater®
0	$3.82 \times 10^7$	$3.82 \times 10^7$	$3.82 \times 10^7$	$3.82 \times 10^7$	$3.82 \times 10^7$
3	$1.95 \times 10^7$	$3.11 \times 10^7$	$1.26 \times 10^5$	$3.39 \times 10^4$	$1.16 \times 10^7$
7	$1.36 \times 10^7$	$2.58 \times 10^7$	$4.14 \times 10^5$	$1.06 \times 10^6$	$3.95 \times 10^7$
14	$1.13 \times 10^7$	$4.66 \times 10^7$	$3.11 \times 10^5$	$6.21 \times 10^5$	$2.68 \times 10^7$
30	$3.34 \times 10^5$	$1.23 \times 10^6$	$1.85 \times 10^5$	$6.38 \times 10^4$	$1.30 \times 10^7$
0	$1.31 \times 10^6$	$1.31 \times 10^6$	$1.31 \times 10^6$	$1.31 \times 10^6$	$1.31 \times 10^6$
3	$1.84 \times 10^6$	$1.18 \times 10^6$	$2.54 \times 10^5$	$1.25 \times 10^5$	$3.41 \times 10^6$
7	$5.77 \times 10^5$	$2.65 \times 10^6$	$1.20 \times 10^5$	$2.46 \times 10^5$	$3.46 \times 10^6$
14	$3.53 \times 10^5$	$1.32 \times 10^6$	$2.23 \times 10^5$	$7.38 \times 10^4$	$8.66 \times 10^5$
30	$4.28 \times 10^4$	$2.11 \times 10^5$	$4.22 \times 10^4$	$4.79 \times 10^5$	$1.42 \times 10^6$

# EXTRACCIÓN DE ÁCIDO NUCLÉICO

## *Extracción de ARN*

- Rneasy minikit (cat # 74104; Qiagen, UK)



\*Siguiendo las recomendaciones y protocolo de los fabricantes.



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



Instituto Colombiano Agropecuario



# RT-PCR CONVENCIONAL TiLV

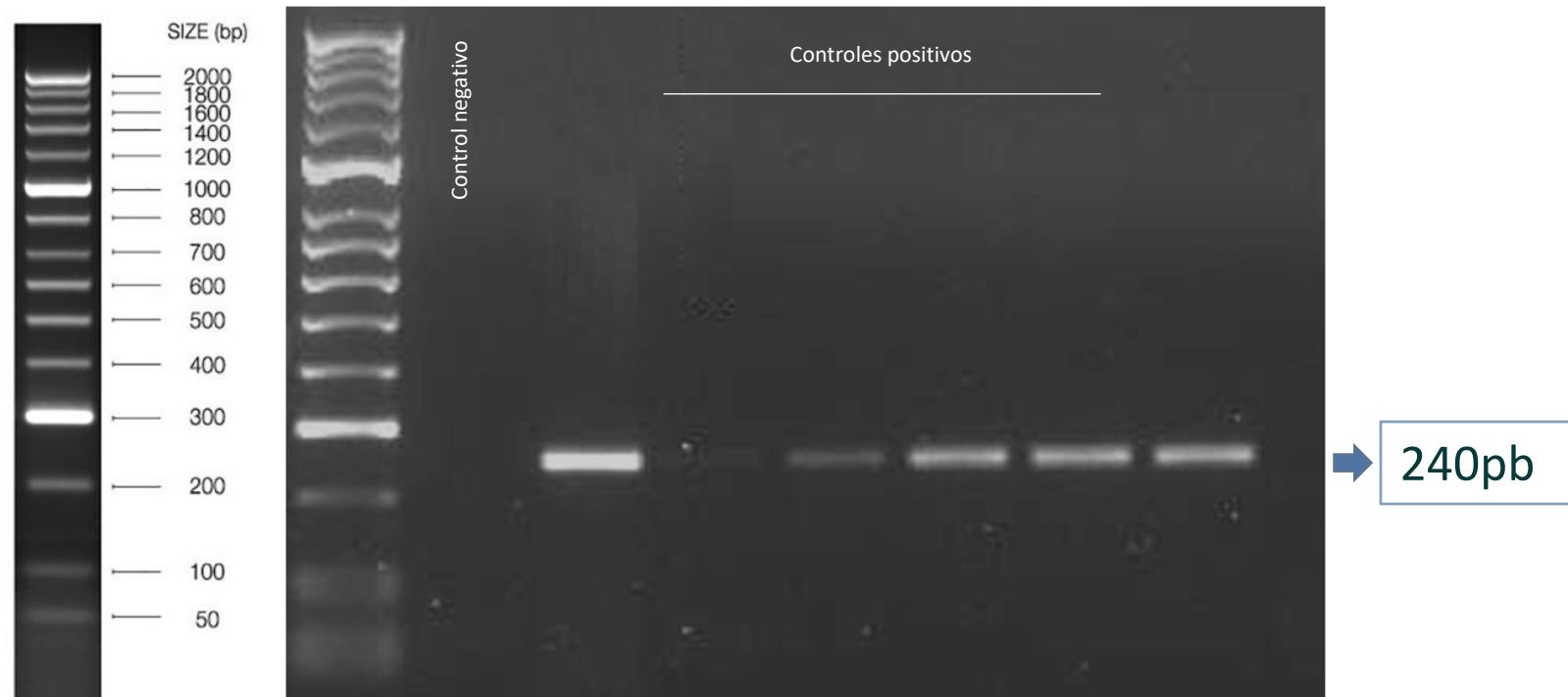
## *Perfil químico*

- SuperScript™ II Reverse Transcriptase
- GE Healthcare illustra™ PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads

Nombre del primer	Secuencia
NM-CLU7-SF	5' AGT TGC TTC TCA YAA GCC TGC TA 3'
NM-CLU7-SR1	5' GAC CTA CAA CTA AGT GGT GAG TGG 3'

- *Tilapia lake virus diagnostic PCR assay. Columbia University*

# RT-PCR CONVENCIONAL TiLV



GSA-MA-LNDV-M-053. Detección del virus de tilapias (Gen de la Proteína Hipotética) por RT PCR Convencional. V1

# RT-PCR SEMI-ANIDADA TiLV

## *Perfil químico*

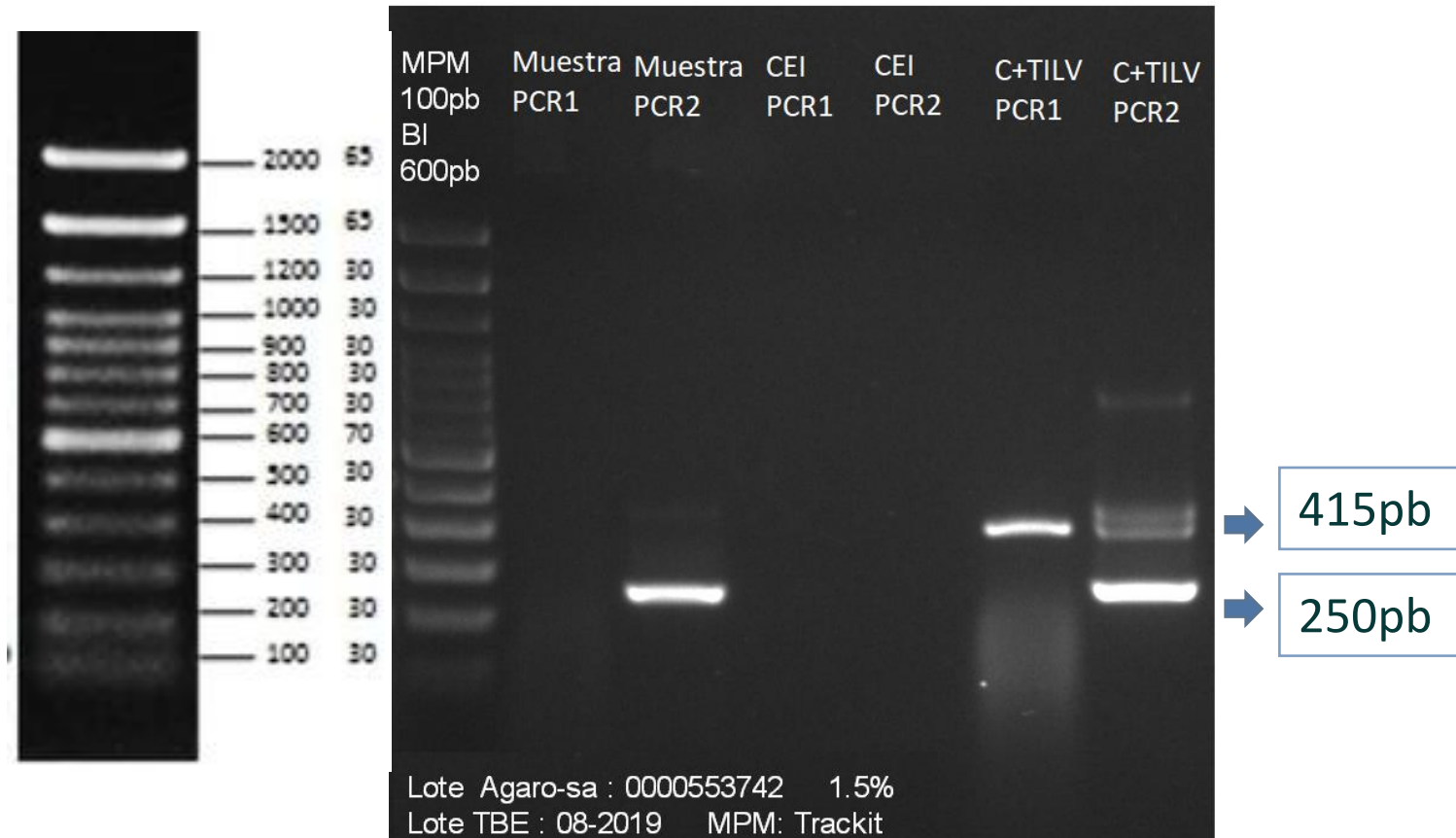
- SuperScript™ III One-Step RT-PCR Invitrogen (RT-PCR)
- GoTaq Flexi Promega (PCR Interna)

Nombre del Primer	Secuencia 5'-3'
Nested ext-1	TATGCAGTACTTTCCCTGCC
ME1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA
ME1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA
7450/150R/ME2	TATCACGTGCGTACTCGTTCAGT

- *Dong HT and et al. A Warning and an improved PCR detection method for Tilapia lake virus (TiLV) disease in Thai tilapia Farms. 2017 NACA*



# RT-PCR SEMI-ANIDADA TiLV



GSA-MA-LNDV-M-094. Detección del virus de la tilapia del lago (TiLV) (gen proteína hipotética) por RT PCR Semianidada. V1



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



Instituto Colombiano Agropecuario

# RT-PCR TIEMPO REAL SYBR TiLV

## *Perfil químico*

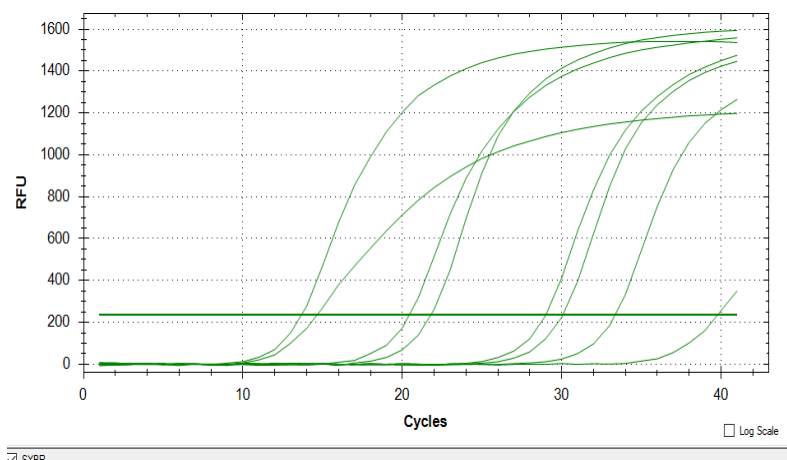
- QuantiTect Sybr Green RT-PCR Kit (Qiagen)

Nombre	Secuencia 5'-3'
TiLV-112F	CTGAGCTAAAGAGGCAATATGGATT
TiLV-112R	CGTGCGTACTCGTTCAGTATAAGTTCT

- *Tattiyapong P, and et al. Development and validation of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction for tilapia lake virus detection in clinical samples and experimentally challenged fish. Journal of Fish Diseases 2018 41, 255–261.*
- *Nicholson, P. and et al. Detection of Tilapia Lake Virus Using Conventional RT-PCR and SYBR Green RT-qPCR. J. Vis. Exp. (141), e58596, doi:10.3791/58596 (2018).*

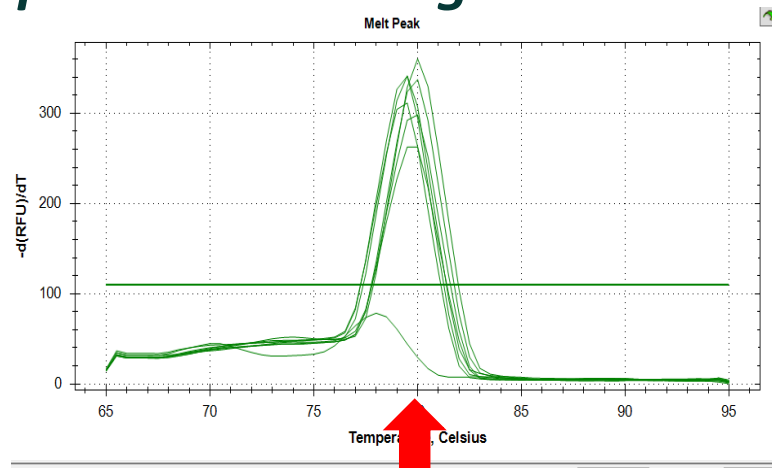
# RT-PCR TIEMPO REAL SYBR TiLV

**Ct**



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
B01	SYBR	TILV	Unkn	PRUEBA	33,36
A01	SYBR	TILV	Unkn	MUESTRA	39,80
H01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV3 1/10	30,08
G01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV3	29,02
F01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV2 1/10	21,80
E01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV2	20,45
D01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV1 1/10	13,68
C01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV1	14,67

## Temperatura melting



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp
A01	SYBR	TILV	Unkn	MUESTRA	None
B01	SYBR	TILV	Unkn	PRUEBA	80,00
C01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV1	79,50
D01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV1 1/10	80,00
E01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV2	79,50
F01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV2 1/10	80,00
G01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV3	79,50
H01	SYBR	TILV	Pos Ctrl	C+TILV3 1/10	80,00



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



Instituto Colombiano Agropecuario

# RT-PCR TIEMPO REAL TAQMAN TiLV

## *Perfil químico*

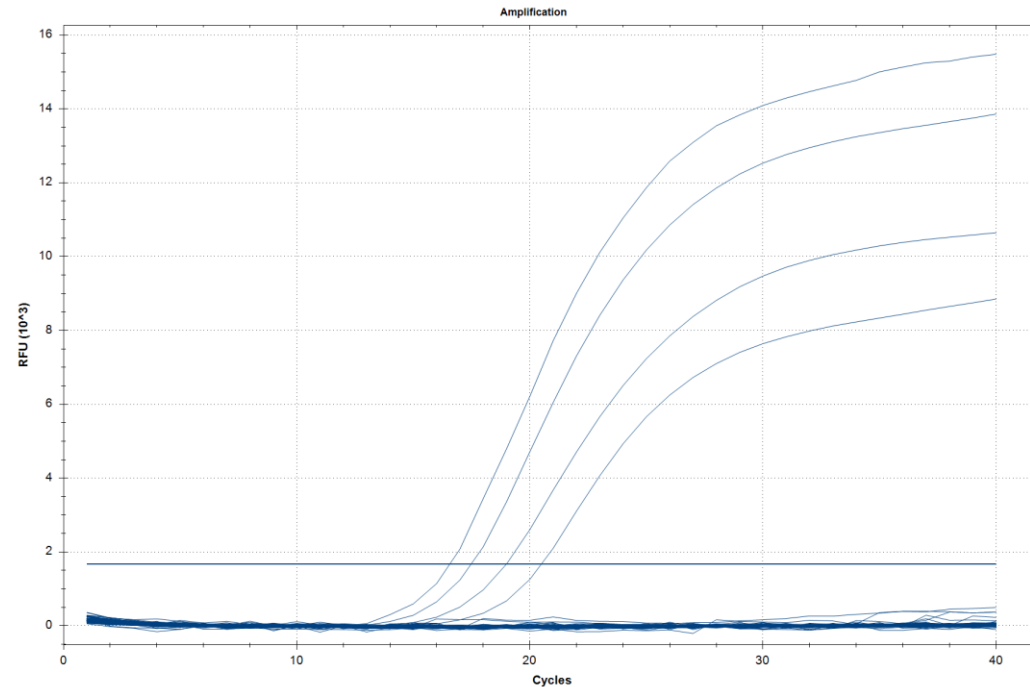
- Quantitect RT-PCR Probe kit (Qiagen)

Nombre	Secuencia 5'-3'
TiLV-93F	5'-AGCCTGCCACACAGAAG-3'
TiLV-93R	5'-CTGCTTGAGTTGTGCTTCT-3'
TiLV-93Probe	5'-FAM-CTCTACCAGCTAGTGCCCA-Iowa Black o BHQ1-3'

- *Pitchaporn Waiyamitra, and et al. A TaqMan RT-qPCR assay for tilapia lake virus (TiLV) detection in tilapia. Aquaculture 497 (2018) 184-188.*



# RT-PCR TIEMPO REAL TAQMAN TiLV



GSA-MA-LNDV-M-095. Detección del virus de la Tilapia del Lago (TiLV) (Gen Proteína Hipotética) por RT PCR en Tiempo Real . V2



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



Instituto Colombiano Agropecuario



# Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario

## *Área de Mezclas Maestras*



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



# Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario

## Área de Extracción



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



Instituto Colombiano Agropecuario

# Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario

## *Área de Amplificación Convencional*



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



# Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario

## Área de Electroforesis



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



Instituto Colombiano Agropecuario

# Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario

## *Área de Tiempo Real*



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



**Muchas gracias por la atención  
prestada**

**Claudia Calderón**

Bacterióloga, MSc Microbiología

Responsable Laboratorio Biología Molecular

Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario ICA

