

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE LINFOCISTIS MEDIANTE ENSAYO ICC-RT-PCR (*INTEGRATED CELL CULTURE-RT-PCR*)

Estefanía J. Valverde, Rocío Leiva, Alejandro Labella, Juan José Borrego y Dolores Castro

Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, ejv@uma.es

La enfermedad de linfocistis es la enfermedad de etiología viral más frecuentemente detectada en la acuicultura marina europea, siendo la principal patología de origen vírico descrita en doradas cultivadas. El agente etiológico de esta enfermedad es el virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV), miembro del género *Lymphocystivirus*, perteneciente a la familia *Iridoviridae*.

Se han desarrollado diversos protocolos de PCR y PCR a tiempo real que permiten la detección y cuantificación del LCDV en diversas muestras, si bien no aportan ninguna indicación de la infectividad de los virus detectados. La detección de partículas víricas infectivas requiere la utilización de cultivos celulares, pero en el caso del LCDV la observación de efectos citopáticos (CPE) es difícil y a menudo está sujeta a subjetividad, especialmente en muestras con baja carga vírica. Por este motivo, en el presente trabajo se ha desarrollado un ensayo de ICC-RT-PCR (*Integrated Cell Culture-RT-PCR*) que permite la detección de partículas infectivas del LCDV. Este ensayo se ha aplicado en combinación con el método del número más probable (NMP) para la determinación del título infectivo en cultivos celulares.

El protocolo de ICC-RT-PCR desarrollado permitió la detección de mRNA viral a partir de células SAF-1 inoculadas con un título infectivo de LCDV de 0,1 TCID₅₀/ml, procesadas a los 5 d p.i, mientras que el límite de detección mediante observación de CPE fue de 10 TCID₅₀/ml a 14 d p.i. La sensibilidad de la técnica ha permitido la detección de partículas infectivas del LCDV en ejemplares de dorada asintomáticos, donde no se observaron CPE en cultivos celulares inoculados en paralelo y mantenidos hasta 14 d p.i.

Este protocolo también se ha aplicado para la determinación del título infectivo de diferentes aislados víricos obtenidos a partir de peces enfermos, reduciéndose de forma considerable el tiempo necesario para realizar la titulación en comparación con el método de la dosis infectiva 50% en cultivos celulares (TCID₅₀) (5 d *versus* 14-21 d, respectivamente). Así mismo, se han titulado stocks víricos obtenidos en cultivos celulares, donde la carga vírica es inferior al límite de detección del ensayo de observación de CPE.

En conclusión, el protocolo de ICC-RT-PCR desarrollado es una técnica sensible, rápida y útil para la detección y cuantificación de LCDV infectivos, lo que la convierte en una herramienta adecuada para el estudio de esta patología viral.

Este trabajo ha sido subvencionado por un proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado por el FEDER (AGL2010-17880), y por un proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía (P12-RNM-2261).