CENAIM INFORMA

Boletín Informativo Quincenal

30 de septiembre del 2001

Desarrollo de Protocolos de Bajo Costo para la Detección del Virus de la Mancha Blanca

La detección de virus mediante PCR es una técnica altamente sensitiva que permite el diagnóstico rápido de diversas enfermedades. Existe una amplia referencia de protocolos de PCR para detección de mancha blanca en diversas publicaciones. En CENAIM se han encontrado que protocolos y kits comerciales dan resultados diferentes cuando se comparan diluciones seriadas. Esto se explica por que la sensibilidad de cada protocolo depende de los iniciadores (secuencias artificiales de DNA) que se utilizan y de las condiciones de amplificación.

Se desarrolló un trabajo con el fin de brindar una herramienta de detección del WSV económica y confiable (ver recuadros). Este protocolo fue evaluado contra dos kits de diagnóstico de WSV distribuidos comercialmente a nivel local. Se utilizaron diluciones seriadas a partir de DNA de tres camarones moribundos infectados previamente con el virus. Los DNAs infectados fueron diluidos en DNA de animales sanos en factores de dilución de 1:10.

Los resultados mostraron que uno de los kits comerciales es menos sensible al no detectar la presencia del virus en diluciones de 10^{-6} y menores, en ninguna de los tres juegos de diluciones evaluadas. Por otro lado el protocolo implantado en CENAIM y el segundo kit comercial dieron resultados similares en 2 de los tres juegos de diluciones evaluadas. En la tercera dilución el segundo kit comercial dió una detección de un orden de dilución superior al kit de CENAIM. Un resultado no esperado fue comprobar que en el kit comercial en el cual se promocionan 4 grados de infección, las diluciones seriadas sólo presentaron dos niveles: alto y muy leve. A pesar de que el kit implementado en CENAIM presenta 3 niveles de infección, es imposible explicar su significado biológico. Esta situación es similar a la del kit comercial en el cual los grados de infección no han sido relacionados con la posibilidad de supervivencia de animales en piscina o si la presencia de positivos puede dar lugar a una epidemia de la enfermedad.

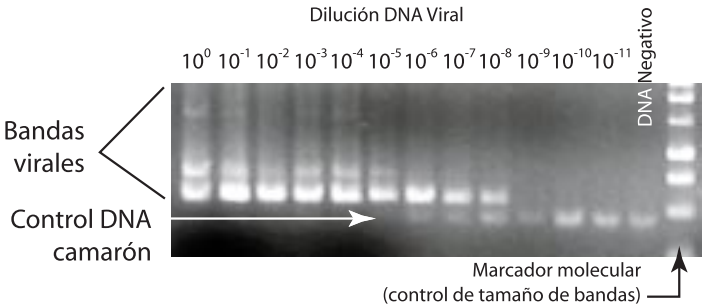

Figura: Dilución seriada de un individuo infectado artificialmente con mancha blanca amplificado con el kit CENAIM-WSV. La banda inferior corresponde al control de calidad del DNA mientras las otras bandas corresponden a la presencia del virus. Muestras 1 a 12: diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-11}. Nótese que el sistema puede detectar hasta una dilución de 10^{-9}, lo que equivale a 1 individuo moribundo entre 1000 millones de animales sanos.

Nuestro sistema de diagnóstico puede ser usado para verificar la presencia o no del virus. Sus ventajas son el costo reducido y su alta sensibilidad. De ser usado por laboratorios locales que al momento utilizan kits comerciales, el costo de diagnóstico por muestra podría ser considerablemente menor.

CARACTERISTICAS DEL PCR IDEAL

- Poseer un alto grado de sensibilidad, es decir detectar la presencia del virus aun cuando este se halle en concentraciones muy bajas. Para lograr esto se deben utilizar iniciadores altamente sensitivos y utilizar un sistema de doble amplificación, conocido como PCR anidado. El PCR de un solo paso es entre 100 y 1000 veces menos sensitivo que el PCR anidado. En el primer paso del PCR anidado se amplifica un fragmento grande del virus y en el siguiente se amplifica una secuencia interna del fragmento previamente obtenido.
- Para el PCR anidado deben utilizarse el menor número de manipulaciones, ya que por su naturaleza se pueden producir contaminaciones cruzadas que afecten al laboratorio con los productos del primer paso de amplificación. Por lo tanto, el PCR anidado debería hacerse en un solo tubo.
- El protocolo debe incluir un control interno para verificar si la extracción de DNA a partir de la muestra original ha sido obtenida correctamente, y que un resultado negativo no se deba a un error en la extracción de DNA.

Se deben evitar protocolos de extracción de DNA y de PCR muy complicados, lo que permite limitar el error humano y acorta los tiempos de diagnóstico.

KIT CENAIM-WSV

Con el fin de desarrollar un protocolo que reuna las características ideales del PCR se procedió a evaluar una serie de iniciadores previamente publicados. De estos se escogieron dos juegos de iniciadores que amplifican un fragmento de 982 y otro de 570 pares de bases del genomio viral. Igualmente se seleccionó un juego de iniciadores que amplifican una secuencia ribosomal del camarón de 441 pares de bases. Iniciadores más componentes de PCR (nucleótidos activados, buffer PCR, cloruro de magnesio y TAQ polimerasa) sirvieron para optimizar dos soluciones, A y B.

El Kit CENAIM-WSV es un sistema de PCR anidado que en el primer paso utiliza entre 9 y 12 microlitros de solución A y entre 1.5 y 2.0 ul de muestra de DNA. Luego de 35 ciclos de amplificación se añaden al mismo tubo entre 9 y 12 microlitros de solución B para amplificar nuevamente durante 35 ciclos. El tiempo total de corrida en el termociclador es de 3 horas 20 minutos. Los productos amplificados son visualizados en geles de agarosa bañados con bromuro de etidio. Este protocolo permite visualizar una banda que corresponde al control de calidad de DNA y entre 1 y 3 bandas que corresponden a la presencia del virus. El número variable de bandas del virus depende de la carga viral de la muestra analizada.

Adicionalmente se implementó una técnica de aislamiento de DNA utilizando una resina sintética basada en quelatos que secuestran iones metálicos que interfieren con el proceso del PCR. Para la extracción de DNA es necesario calentar una muestra pequeña de tejido a 60º C por dos horas en la solución quelatante y centrifugarla, luego de lo cual se puede proceder al PCR. Este sistema es extremadamente simple y económico al compararlo con otros métodos previamente utilizados en nuestro laboratorio.

Trabajo realizado por Franklin Pérez, Ph.D.c.; Irma Betancourt, Oc.; Mariuxy Zhunaula, Acui.