



ACLARACIONES SOBRE EL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA Y LA TECNICA DEL PCR

Dra. Victoria Alday de Graindorge
CSA / Directora del Proyecto Unidad de Diagnóstico financiado por la Unión Europea

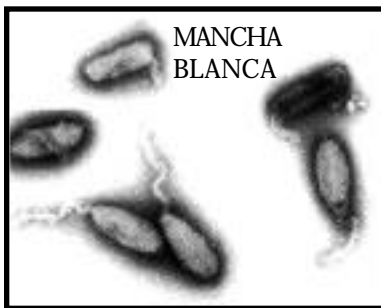
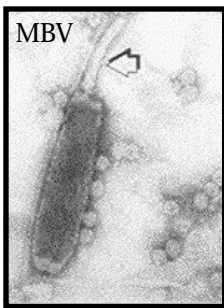


La finalidad de este artículo es la de aclarar algunas de las dudas que actualmente tienen los camaróneros, generadas por falta de información o por información errada disponible en el medio.

¿A QUE GRUPO PERTENECE EL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA?

El virus de la Mancha Blanca tiene varias características en común con los baculovirus, tales como: la estructura bacilar, presencia de envoltura, tamaño, DNA de doble hélice y método de replicación intranuclear. Las diferencias más importantes son: la producción de cuerpos de oclusión y el que no mantiene las secuencias conservadas de los baculovirus.

Inicialmente los baculovirus estaban



Fotografía de microscopio electrónico de virus purificado de MBV y Mancha Blanca con tinción negativa.

clasificados en tres grupos (A,B y C) siendo el tipo C los baculovirus no ocluidos. Desde 1995 los baculovirus no ocluidos (Mancha Blanca y BMN-Baculovirus midgut necrosis) fueron sacados de esta clasificación ya que no tienen suficientes características en común con el resto de los baculovirus.

Estudios a nivel molecular han mostrado que el virus de la Mancha Blanca pertenece a un grupo nuevo diferente a todos los virus conocidos y ha quedado clasificado como virus "no clasificado".

¿EXISTE LA POSIBILIDAD DE TENER UNA REACCION CRUZADA CON EL BACULOVIRUS PENAEID (BP) DURANTE LOS ANALISIS DIAGNOSTICO PARA EL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA POR PCR?

En 1998, el Dr. Lightner y la Dra. Lo demostraron que no hay reacción cruzada.

Las secuencias conservadas de baculovirus están relacionadas con el gen que codifica la producción de la proteína polyhedrina que es común a todos los baculovirus.

Esta proteína es la que forma el cuerpo de oclusión donde los virus están "ocuidos" (escondidos). Es una forma de proteger el virus cuando se libera al exterior (ej. BP y MBV).

El virus de la Mancha Blanca no produce cuerpos de oclusión y no tiene polyhedrina. Por lo tanto no

tiene las secuencias conservadas típicas de los baculovirus por lo que no habría reacción cruzada.

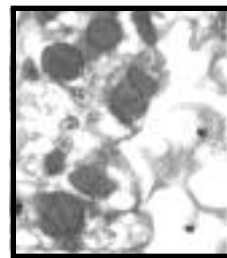
En Ecuador la duda sobre la reacción cruzada surgió de unas muestras de virus BP purificado en 1997 que se corrieron con primers de la Mancha Blanca dando positivo. Con el producto amplificado de estas muestras la Dra. Lo ha realizado PCR usando primers de diferentes regiones del ADN de la Mancha Blanca, dando otra vez positivo y concluyendo que estas muestras, de BP están contaminadas con WSSV.

El interés de estas muestras de BP contaminadas es saber si la contaminación ocurrió durante su preparación en 1997 o fue producto de una contaminación posterior. Es posible que la contaminación ocurriera durante la preparación de la muestra.

El virus BP y el de la Mancha Blanca son de un tamaño similar y con las técnicas disponibles en este momento para virología de crustáceos es muy difícil poder separarlos, ya que ésta se hace por gradiente y la "purificación" es sólo una separación de partículas según su tamaño.



Hepatopáncreas con células infectadas de BP. El cuerpo de oclusión tiene forma triangular.



Hepatopáncreas con células infectadas con MVB. Existen cuerpos esféricos de oclusión dentro de los núcleos.



Cuerpos de inclusión de Mancha Blanca. No hay cuerpo proteico en el interior del núcleo.

Hemos encontrado placas histológicas de camarón de la Provincia del Guayas con las lesiones típicas del virus de la Mancha Blanca en 1997, esto apoyaría la hipótesis de que la contaminación ocurrió cuando se preparó la muestra.



SI EL VIRUS ESTA PRESENTE EN EL ECUADOR DESDE EL AÑO 1997, ¿POR QUE LOS PROBLEMAS APARECIERON EN ESTE AÑO?

Es normal que cuando aparece un nuevo virus, necesita tiempo para dispersarse y multiplicarse hasta alcanzar una masa crítica que pueda causar mortalidades significativas. Aparentemente hay también factores ambientales que “disparan” la presencia de un determinado virus.

¿ES POSIBLE QUE EL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA PRESENTE EN EL ECUADOR SEA DIFERENTE AL DEL RESTO DE AMERICA Y ASIA, CREANDO LA NECESIDAD DE TENER PRIMERS ESPECIFICOS PARA NUESTRO PAIS?

Hasta el momento no se han encontrado diferencias significativas entre diferentes virus de Mancha Blanca aislados en Asia y América, por lo que no se requiere el diseño de primers específicos para “el virus de la Mancha Blanca ecuatoriano”. Esto ha sido confirmado por el Dr. Flegel en Tailandia, el Dr. Lightner en los Estados Unidos, el Dr. Bonami en Francia, la Dra. Lo en Taiwan y el Dr. Hodgson en Australia; estas personas pertenecen a grupos que trabajan con el virus de la Mancha Blanca desde que éste apareció y han comparado un gran número de cepas.

¿EN QUE RADICA LA DIFERENCIA ENTRE LAS TECNICAS DE PCR Y DOT BLOT Y A QUE SE DEBEN LAS DIFERENCIAS EN LOS RESULTADOS DE ESTAS?

El dot-blot detecta el ADN mientras que el PCR lo detecta y lo amplifica (multiplica), por lo que el PCR es mucho más sensible.

Se han reportado resultados negativos por PCR y positivos por dot-blot, lo cual es sorprendente. Se

ha argumentado que la diferencia en la sensibilidad es por el uso de proteinasa K (enzima que digiere la proteína) durante la extracción de ADN. Si el virus de la Mancha Blanca produjera cuerpos de oclusión, este estaría embebido en proteína, y sería conveniente usar proteinasa K para liberar el virus. Sin embargo, la Mancha Blanca no produce cuerpos de oclusión, sólo de inclusión donde el virus está dentro del núcleo y no embebido en proteína.

El uso de proteinasa K en la extracción de ADN en muestras infectadas de Mancha Blanca podría ayudar a digerir la envoltura proteica del virus e inhibidores de la reacción de origen proteico. Esto podría hacer que la reacción de PCR sea aún más sensible, pero no podría hacer un Dot -Blot más sensible que un PCR.

¿A QUE SE DEBE LA INCONSISTENCIA EN LOS RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE PCR?

Se han reportado diferencias entre resultados de muestras analizadas con la Técnica del PCR. Estas diferencias pueden deberse a:

- Laboratorios/técnicos
- Protocolo usado
- Forma de la toma de muestras
- Limitaciones estadísticas
- Diferencias debidas a los laboratorios/técnicos

Es posible que diferentes laboratorios den resultados diferentes a las mismas

muestras. Para comprobar si esto ocurría se ha organizado una prueba de intercalibración. Para lo cual se prepararon 15 muestras de ADN purificado positivas y negativas y se distribuyeron entre los laboratorios participantes.

Prueba de intercalibración

Todos los laboratorios de servicio de diagnóstico de la enfermedad de la Mancha Blanca utilizando la Técnica del PCR que existen en Ecuador fueron invitados a participar en esta prueba de intercalibración:

- Centro de Servicios para la Acuicultura-CSA,
- DIBSA,
- ACUATECSA,
- ENACA,
- Lab PCR, y
- Carrera Internacional (quienes rechazaron la invitación).

Adicionalmente ciertas Instituciones extranjeras fueron invitadas a participar en la intercalibración:

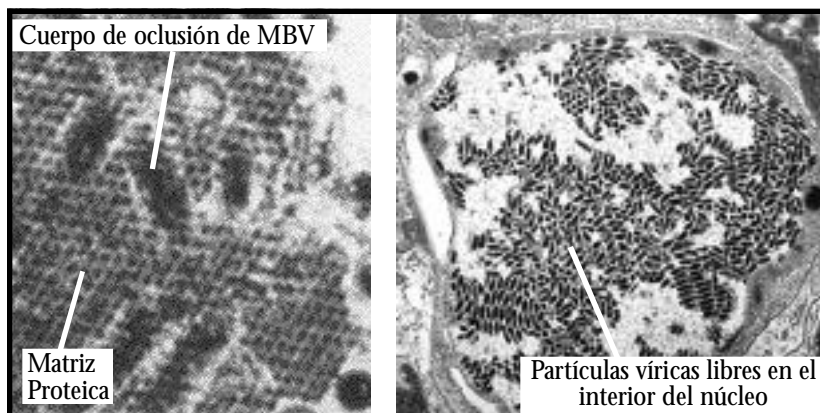
- Universidad de Arizona (Dr. Lightner)
- Instituto Smithsonian de Panamá (Dra. Gómez)
- Corpogen de Colombia (Dra. Del Portillo)
- Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Perú (Dr. Hung)

No todos los resultados de las instituciones extranjeras se han recibido hasta el momento.

Se compararon resultados con los 3 protocolos que se usan en este momento en Ecuador:

- Kit de DiagXotics
- Kit IQ2000

Primers Dra. Lo y protocolo completo De 148 reacciones realizadas por los centros ecuatorianos, 4 han dado resultados diferentes (2.7%). Estas diferencias se deben dos de ellas a contaminación y las otras





Artículos

dos a una ligera pérdida de sensibilidad. Los resultados del Dr. Lightner de la Universidad de Arizona concuerdan en un 100% con los resultados del CSA que se han usado como referencia para los otros laboratorios.

Diferencia de sensibilidad debido a las diferencias en los protocolos utilizados

Adicionalmente en esta intercalibración se puede concluir que existe diferente sensibilidad entre protocolos.

Los resultados del CSA y DIBSA coinciden en que el kit IQ2000 es más sensible que el kit de DiagXotics y que los primers de la Dra. Lo. Los positivos leves con IQ2000 son negativos con DiagXotics y con los primers de Lo.

Diferencias debidas a la forma de tomar la muestra

La muestra debe ser homogénea y representativa de la población. Para larvas es necesario tomar varios miles de animales de diferentes puntos en el tanque y juntarlos en un recipiente, se hace girar el agua y se toman los animales del centro donde tenemos más posibilidades de encontrar animales infectados.

Si la larva se va a tratar con formol para estresarla, hay que lavarla bien antes de fijarla, ya que residuos de formol inhibirán la reacción de PCR.

La muestra debe ser tomada en etanol al 95%. NO USAR OTROS

ALCOHOLES

ya que pueden contener inhibidores de la reacción de PCR.

Diferencias debidas a limitaciones estadísticas

Se recomienda tomar 150 animales. Estadísticamente el resultado debería detectar una prevalencia mínima del 2% con un 95% de confianza. En un tanque con una prevalencia menor del 2%, si se toman varias muestras, es normal que los resultados sean diferentes.

Ejemplo:

La prevalencia en el Tk1 (+) es como mínimo del 2%. Al mezclarla a partes iguales con el Tk2 (-), el resultado es negativo. Esto significa que la prevalencia en el tanque 1 es menor del 4%.

El método no es perfecto y probablemente queramos buscar estadísticamente más seguridad. En Tailandia se estaban tomando 30 larvas/tanque que corresponde a una prevalencia del 10% y con ello conseguían un 85% de éxito en las cosechas. Por lo que con muestras de 150 larvas deberíamos tener mayor probabilidades de éxito.

Si se quiere comparar resultados entre laboratorios, hay que partir de la misma muestra. Una muestra dividida en 2 son dos muestras. Para dividir una muestra, deben macerar los animales en buffer de lisis (0.05N NaOH + 0.025%SDS) y dividir el sobrenadante.

CSA

	IQ2000	DiagXotics	Primers Lo
1	+	+	+
2	+ leve	-	-
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+ leve	-	-
7	+ leve	-	-
8	+	+	+
9	+	+	+
10	-	-	-
11	-	-	-
12	+ leve	-	-
13	+	+	+
14	-	-	-
15	-	-	-

DIBSA

	IQ2000	DiagXotics	Primers Lo
1	+	+	+
2	+ leve	-	-
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+ leve	-	-
7	+ leve	-	-
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+ leve	-	-
11	+ leve	-	-
12	+ leve	-	-
13	+	+	+
14	-	-	-
15	-	-	-

	KIT DiagXotics				Univ. Arizona	KIT IQ2000		
	CSA	DIBSA	AQUA-TECSA	ENACA		CSA	DIBSA	LAB PCR
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-

* Muestra sin ADN