

OPTIMIZACION DEL PCR-ANIDADADO, PARA LA DETECCION MOLECULAR DEL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA EN CAMARON

Laura Perales, Ana M. Sifuentes-Rincón y Hugo A. Barrera-Saldaña

Centro de Biotecnología Genómica-IPN. Blvd. Del Maestro esq. con Elías Piña Col Narciso Mendoza, Cd. Reynosa, Tam. C.P 88710 FAX (89) 25 16 56.

E-mail: lauraelena2000@latinmail.com

Palabras clave: PCR, camarón, detección

Introducción. A nivel mundial, las enfermedades virales han surgido como uno de los problemas más importantes en el cultivo de camarón (Peneidos). Actualmente, una de las principales enfermedades virales que afectan las especies de camarón son el Virus de la Mancha Blanca (WSV), el cual ha sido detectado en granjas a lo largo de la costa del Golfo de México, causando importantes pérdidas económicas. En nuestro país, los recursos camaroneros han sido los más importantes, por tal razón la implementación de estrategias para el control y manejo de la sanidad en las granjas acuícolas es de vital importancia. Los sistemas de detección para las enfermedades del camarón son similares a los usados en otro tipo de especies animales. A la fecha, existen una serie de metodologías moleculares para la detección de agentes infecciosos en las granjas de camarón. Dentro de las ventajas que ofrecen los métodos moleculares están su sensibilidad y especificidad. Sin embargo, algunos de éstos resultan poco prácticos para su implementación como diagnóstico de rutina. La Biotecnología ofrece a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) una alternativa de diagnóstico para la detección de agentes infecciosos, ya que además de las ventajas antes señaladas, la técnica puede ser optimizada para lograr un resultado confiable en poco tiempo y con costos relativamente bajos. Por tal razón, en este trabajo nos propusimos optimizar la metodología de detección del WSV basada en el uso de un estuche comercial, el cual es el más frecuentemente usado en los laboratorios del país.

Metodología. De acuerdo al procedimiento recomendado por la casa comercial, identificamos que la amplificación está basada en un PCR-anidado. Esta estrategia consiste en dos PCR sucesivos, cada uno de los cuales requiere el uso de un par específico de iniciadores en donde el producto de la primer reacción es el DNA blanco, para la segunda. El siguiente paso fue la determinación de la eficiencia de amplificación de la primera PCR, con el fin de calcular la concentración de templado necesaria para el resultado óptimo del segundo PCR. Una vez calculada, se diseñaron una serie de experimentos para determinar el número mínimo de ciclos para la obtención de dicha concentración. Ya establecido el procedimiento se puso a prueba el uso del número calculado de ciclos para el primer

PCR, acoplándolos inmediatamente y después de la adición del segundo par de iniciadores a la segunda amplificación.

Resultados y Discusión. Una vez analizado paso a paso el protocolo propuesto por la compañía distribuidora del estuche, identificamos el procedimiento como PCR-anidado. La meta de nuestra optimización fue lograr el mismo resultado obtenido siguiendo al pie de la letra las instrucciones del proveedor del estuche, pero reduciendo los tiempos y costo por análisis. Con nuestra optimización, logramos reducir el número de ciclos de la primer PCR de 30 a 5, lo cual da un ahorro en tiempo de 1h. Durante la segunda amplificación, no se logró reducir el número de ciclos, sin embargo puesto que no fue necesario utilizar reactivos adicionales para la preparación de la segunda PCR, el costo total de las dos reacciones se redujo en un 50%. Adicionalmente, el tiempo total estimado para la obtención del resultado final se redujo a la mitad.

Conclusiones. Uno de los principales problemas en el establecimiento de las técnicas moleculares como métodos rutinarios de diagnóstico, son sus altos costos. En nuestro país, este tipo de problemas se ven incrementados por la necesidad de importar toda o gran parte de esta tecnología, sin embargo con nuestro trabajo demostramos que la implementación y optimización de los sistemas comerciales de detección molecular, permite hacerlos económicamente viables sobre todo en el caso de enfermedades donde la detección oportuna del agente infeccioso, juega un papel preponderante en el control sanitario.

Referencias.

- 1.Consulta en línea, Diagnostic Procedures ;http://202.167.121.158/sardi/cd_shrimp/patho/diagn.htm
- 2.Consulta en línea,Mexican emergency official standard NOM-EM-001-SEMARNAP-PESC-1999; <http://www.nmfs.noaa.gov/trade/mexengles.html>
- 3.Hecker Karl H. and Roux Kennet H. High and Low Annealing Temperatures Increase Both Specificity and Yield in Touchdown and Stepdown PCR. Biotechniques. Research Reports;Vol. 20, No.3 March 1996. Pags. 478-485
- 4.Edwards et. al., 1991, NAR 19:1349.
- 5.DiagXotics,Inc. Catalog No.WSV-PrimerB Version 2;27 Cannon Rd., Wilton, CT 06897