



00344  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO 1

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Demostración del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en  
camarones penidos de importancia comercial a través de  
técnicas histológicas convencionales y moleculares

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**  
(Biología de Sistemas y Recursos Acuáticos)

P R E S E N T A

Biól. José Luis Bortolini Rosales

Director de Tesis: Dr. Juan Luis Cifuentes Lémus

MÉXICO, D. F.



2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

### **Agradecimientos**

Al Dr. **Juan Luis Cifuentes Lemus**, por dirigir este trabajo, siendo un ejemplo profesional en mi persona. Gracias.

A la M. en C. **María del Pilar Torres García**, del Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México por su paciencia y consejos. Gracias.

Al M. en C. **Jorge Romero Jarero**, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por sus comentarios durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. **Fernando Álvarez Noguera**, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el tiempo y comentarios a este trabajo.

A la Dra. **Ana Margarida Trigo de Sousa Roque**, del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A. C., Unidad Mazatlán, por el tiempo y comentarios a este trabajo.

Al M. en C. **Leobardo Montoya Rodríguez** y a la Q. B. P. **Alicia Campos Martínez**, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Unidad Mazatlán, por sus conocimientos y apoyo en la parte experimental del trabajo.

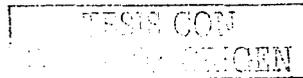
A la M. en C. **Adriana Muñoz Hernández** por su tiempo y consejos en la edición de este trabajo.

Al M. en C. **Alejandro Martínez Mena**, la M. en F. **Ana Isabel Bieler Antolin** y el Biol. **José Antonio Hernández**, del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el tiempo dedicado a la elaboración del material fotográfico.

A la P. de B. **Eva Muñoz Mancilla**, del Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo dado en la elaboración de las preparaciones histológicas.

A la Biol. **Marcela G. Frías Mondragón**, por el tiempo y su amistad incondicional.

A **mis compañeros** del Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo.



### **Dedicatoria**

#### **A Luis y Susana:**

Padres ejemplares en todos sentidos, que con su amor y apoyo incondicional en cualquier momento y situación he salido adelante, porque sin ellos no estuviera aquí y ahora. Gracias mil.

#### **A Adriana:**

Amor incondicional, apoyo en todo momento y esperanza en mi vida. Gracias te doy por todos estos años de alegría y paciencia. Te amo.

#### **A Roberto y Liliana Gabriela:**

Por todo el apoyo y cariño que me han dado, en especial por ese par de diablillos que amo como a mis propios hijos, Rogelio y Gabriela. De verdad, gracias.

#### **A los abuelos:**

A los cuatro, Victorio y María, Roberto y Carmen, ejemplo todos ellos de perseverancia en la vida. Gracias por estar conmigo, estén donde estén.

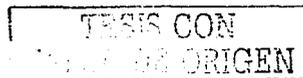
#### **A todos los tíos, tías y primos:**

Por darme fuerza y confianza en ustedes.

#### **A los amigos de la vida:**

Por su amistad.

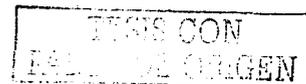
A todas aquellas personas que se han cruzado en el camino de mi vida, hermosa por cierto, y que en su momento me han dado un poco de alegría.



Cuando la preparación no cambia en periodos inmensos, las tradiciones pasan intactas a la generación siguiente. Pero cuando lo que se tiene que aprender, cambia de prisa, especialmente en el curso de una generación, se hace mucho más difícil saber que enseñar y como enseñarlo. Entonces, los estudiantes se quejan de la pertinencia de lo que se explica; disminuye el respeto por sus mayores. Los profesores desesperan ante el deterioro de los niveles educativos y lo caprichoso de los estudiantes.

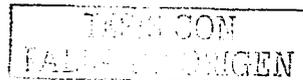
En un mundo en transición, estudiantes y profesores necesitan enseñarse a si mismos una habilidad esencial: aprender a aprender.

Carl Sagan  
El mundo y sus demonios, 1995



## INDICE

	Página
Resumen	
1.0 Introducción	1
1.1 Antecedentes	5
1.2 Características del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca	12
1.3 Objetivos	16
2.0 Material y Método	17
2.1 Colecta y aclimatación de los organismos	17
2.2 Preparación del inóculo viral	19
2.3 Infección Experimental	19
2.4 Fijación y conservación de las muestras	20
2.5 Técnica histológica	20
2.6 Técnicas moleculares	21
3.0 Resultados	24
3.1 Técnica histológica	25
3.2 Técnicas moleculares	34
4.0 Discusión	38
5.0 Conclusiones	42
6.0 Recomendaciones	44
7.0 Bibliografía	46
8.0 Anexos	i -xi
Inoculo viral	i
Moreno de Bismark	i
Hematoxilina-Eosina	ii
Hematoxilina-Eosina/Floxina	iii
Técnica de Mallory	iv
Tinción de Lendrum	v
Protocolo de PCR para WSSV (IQ2000)	vi
Extracción de ADN	vii
Protocolo de Hibridación <i>in situ</i>	ix



## Resumen.-

En el orbe, la producción total de camarón tiene dos fuente principales, una, la captura en aguas oceánicas y zonas costeras y, dos, el cultivo de este organismo. En 1997, la producción total mundial de camarón fue de 3,477,000 toneladas. México participa con 90,000 toneladas de las cuales 18,000 son resultado de la producción en granjas en sus diferentes modalidades (extensivas, semi-intensivas e intensivas). En las poblaciones de camarones peneidos, se observan graves problemas de sanidad, uno de los cuales es el que se refiere a los diferentes tipos virales que atacan a este tipo de organismos, particularmente en las granjas camaronícolas.

En el país, se detectó recientemente (1999) la enfermedad de la Mancha Blanca o White Spot Syndrome Virus (WSSV), la cual produce una alta mortalidad en las poblaciones de camarones, principalmente en los Estados de Nayarit, Sinaloa y Sonora.

El objetivo de este trabajo es caracterizar a los cuerpos de inclusión así como las alteraciones histológicas producidas por el síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarones peneidos de importancia comercial a través de técnicas histológicas convencionales y moleculares.

Se colectaron organismos de la especie *Litopenaeus vannamei* que presentaban las características macroscópicas de la enfermedad y se aplicó la técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) de los cuales se hizo un homogenizado de tejidos del cefalotórax para extraer el material genético viral para posteriormente inocular organismos sanos que desarrollasen el cuadro clínico característico de WSSV.

Posteriormente, se colectaron organismos sanos que fueron divididos en dos grupos para la fase experimental, el primero, que fue el grupo control y el segundo, el grupo al cual se inyectó el inóculo viral. Previo a ser inculados, estos organismos se mantuvieron en cuarentena por un periodo de 14 días y se les aplicó la técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena comprobando la ausencia de material viral en los camarones.

A los organismos del primer grupo se les inyectó una solución buffer con la que se preparó el inóculo, el cual sirvió de placebo; al segundo grupo, se les inyectó 0.01 ml de inóculo proveniente de camarones infectados y positivos por medio de la técnica anterior en la parte lateral de la unión del tercero y cuarto segmentos abdominales.

Las muestras fueron fijadas en solución Davidson durante 48-60 horas y conservadas en alcohol 70° hasta el momento de su procesamiento histológico y otras se conservaron en alcohol 70° para su procesamiento por medio de PCR. Para aplicar esta prueba, sin sacrificar a los organismos, se tomaron los dos pleópodos del primer segmento abdominal y el resultado fue corrido en un gel de agarosa.

Las muestras a ser procesadas por técnica histológica, fueron deshidratadas, incluidas en parafina y cortadas a un grosor de 5-7  $\mu\text{m}$ , se emplearon diferentes tinciones y se aplicó la prueba de hibridación *in situ*.

Como resultado de la infección experimental, se observaron precipitaciones de sales de calcio en el caparazón a nivel del cefalotórax, formando manchas blancas además de la expansión de los cromatóforos de los apéndices locomotores y antenas. El abdomen presenta opacidad en el tejido muscular. Se aplicaron diferentes técnicas de tinción, realizando las observaciones con microscopía fotónica. Por medio de las técnicas de tinción convencionales, se observaron principalmente, células hipertrofiadas del epitelio del tracto digestivo, tejido branquial y tejido conjuntivo en general con prominentes cuerpos de inclusión.

En el caso de la prueba de hibridación *in situ*, se observaron evidentes precipitaciones azules. Por medio de la técnica de PCR, se pudo observar el corrimiento del material genético viral obteniendo bandas de corrimiento de diferentes pesos moleculares entre ellas la correspondiente al material genético viral.



## Summary.-

In the world, the total production of shrimp has two main source, the capture in oceanic waters and coastal zones and, the cultivation of this organism. In 1997, the production world total of shrimp was from 3,477,000 tons. Mexico participates with 90.000 tons of which 18.000 is been of the production in farms in their several modalities (extensive, semi-intensive and intensive). In the populations of penaeid shrimps, serious problems of health are observed, one of which it is the one that it refer to the several viral types, particularly in the shrimp farms.

In Mexico, it was detected recently (1999) the illness of White Spot Syndrome Virus (WSSV), which produces a high mortality in the populations of shrimps, mainly in the states of Nayarit, Sinaloa and Sonora.

The objective of this work is characterize to the bodies of inclusion as well as the histological alterations produced by the syndrome of the white spot (WSSV) in penaeid shrimps of commercial importance through conventional histological and molecular techniques.

Organisms of *Litopenaeus vannamei* were collected that presented the macroscopic characteristic of the illness and were applied the technique of PCR (Polimerase Chain Reaction) of which it was made a mix of knitting of the cephalotorax in order to extract the genetic viral material for later on inoculate healthy organisms that development the clinical characteristic square of WSSV.

Later on, healthy organisms were collected that they were divided in two groups for the experimental phase, the first, that was the group control and the second, the group to which the virus was injected. Previous to be inoculated, these organisms stayed in quarantine for a period of 14 days and applied them the technique of PCR checking the absence of viral material in the shrimps.

To the organisms of the first group injected them a buffer solution, which was used as placebo; to the second group, injected them 0.01 ml of coming virus from infected shrimps and positives by means of the previous technique in the lateral part of the union of the third fourth abdominal segments.

The samples were noticed Davidson solution for 48-60 hours and conserved in alcohol 70° until the moment of their histological prosecution and another they were conserved 70° for their prosecution by means of PCR in alcohol. In order to apply this test, without sacrificing to the organisms, they took the two pleopods of the first abdominal segment and the result was run in a gel of agarose. The samples to be processed for histological technique, they were dehydrated, included in paraffin and cut to of 5-7  $\mu\text{m}$ , several staining was used and was applied the test of *in situ* hybridization.

As a result of the experimental infection, precipitations were observed of you leave from calcium in the shell to level of the cephalothorax, forming white stains besides the expansion of the chromatophore of the appendixes locomotives and antennas. The abdomen presents opacity in the muscular fabric. Several staining techniques were applied, carrying out the observations with photonic microscopy. By means of the techniques of conventional staining, they were observed mainly, hypertrophied cells of the epithelium of the digestive tract, branchial and connective tissue in general with prominent bodies of inclusion.

In the case of the test of *in situ* hybridization, evident blue precipitations were observed. By means of the technique of PCR, one could observe the landslide of the genetic viral material obtaining bands of landslide of several molecular weight between them the corresponding to the genetic viral material.

G



**Demostración del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarones  
peneidos de importancia comercial a través de técnicas  
histológicas convencionales y moleculares.**

Por: **Biol. José Luis Bortolini Rosales**

**1.0 Introducción**

En 1988, la producción de camarón por concepto de captura y cultivo a nivel mundial fue de 3,151,000 toneladas; en 1997, esta cantidad se incrementó a 4,419,000 toneladas. La producción del camarón en estanques de cultivo ha observado un rápido crecimiento en los últimos años. Muchos países en el mundo han adoptado esta práctica; en 1988, la producción mundial de camarón por cultivo fue de 576,000 toneladas, que representó el 22% de la producción total mundial; en 1995, este valor fue de 952,000, el valor más alto de producción en la década de los años 90; y para 1997, 942,000 toneladas, un 61.14% superior a la producción de 1988, pero solo un 27% de la producción total mundial (FAO, 1997b). En México, el comportamiento es similar al que se observa en el ámbito internacional. En 1988 la producción de camarón por cultivo era de 1,000 toneladas y en 1997 se alcanza la cifra de 18,000 toneladas, siendo la producción más alta en esta década, con un incremento del 1,800% en tan solo 9 años (SEMARNAP, 1999). Según el Instituto Nacional de la Pesca, en el año 2000, se obtuvieron 33,480 toneladas por concepto de acuacultura, 61,597 por concepto de pesca obteniendo un total de 95,077 toneladas durante este año.

En el orbe, existen aproximadamente, un millón de hectáreas de estanques con una producción promedio de 630 kilogramos por hectárea. Las granjas del mundo abastecen al mercado con el 25% del camarón disponible, siendo el otro 75% producto de la pesca en aguas abiertas. En 1980, del camarón disponible en el mercado, sólo el 2% provenía de las granjas de cultivo, para este siglo, la meta es obtener una producción del 50% por concepto de cultivo y el resto proveniente de los mares y esteros por concepto de captura. En la industria del cultivo del camarón existen también, la creación de miles de fuentes de trabajo, ya sea de manera directa o indirecta, millones de dólares por concepto de producción y por

consiguiente el aumento de fuentes de proteínas que cada vez son más necesarias para cubrir la demanda mundial (FAO, 1997a).

Las pérdidas por enfermedades están reconocidas como una constante determinante en la producción acuícola, afectando por ende el desarrollo económico e ingresos del sector en muchos países del mundo. Las enfermedades son un factor limitante en la producción de camarones y el hecho de no tener enfermedades es favorable para incrementar el desarrollo del sector. (Conroy y Conroy, 1990)

A su vez, en la industria camaronícola existen pérdidas económicas que se atribuyen a las enfermedades; en ABD/NACA de 1991, se indica que en 1990, se perdieron 1,400 millones de dólares en países en vías de desarrollo. El costo de la merma en la producción de China en 1993 fue aproximadamente de 1,000 millones de dólares. En Tailandia (1996), esta suma fue de 500 millones de dólares, atribuido principalmente a dos enfermedades: la enfermedad de la cabeza amarilla (Yellow Head Virus, YHV o Yellow Head Disease, YHD) y la enfermedad de la mancha blanca (White Spot Syndrome Virus, WSSV o White Spot Disease, WSD) (Alday-Sanz y Flegel, 1997).

Son varios los factores que se relacionan con el incremento de la incidencia de enfermedades, algunos de ellos, factores ambientales y la calidad de agua, que causan el incremento de la transferencia de patógenos, por movimiento de organismos causando las epizootias. Existen estimaciones, basadas en la sobrevivencia de las granjas de 16 países, que sugieren que las enfermedades y los problemas ambientales causan una pérdida anual de unos 3,000 millones de dólares. Como ejemplo, en 1993, Ecuador perdió 23,000 toneladas (22% de su producción) debido a la enfermedad producida por el virus del síndrome de Taura. El confinamiento de un gran número de organismos acuáticos en pequeñas superficies de agua como estanques, canales de corriente rápida o jaulas, aumenta notablemente la posibilidad de que entren en contacto organismos hospedero y organismos patógenos, produciendo enfermedades de diversa índole, ocasionando mortalidades de magnitudes variables, que de acuerdo al patógeno involucrado, podrían llegar a ser hasta del 100%, como por ejemplo, las virosis y bacteriosis (Provenzano, 1985).

El control de las enfermedades depende de un complejo de tres factores, que son: **diagnos****is**, **prevención** y **tratamiento**.

- 1) La **diagnos****is**, que es el conocimiento de los signos y síntomas de las enfermedades, incluye el conocimiento del ciclo de vida y ecología del patógeno, siendo una etapa crítica para cualquier programa de control.
- 2) La **prevención**, o toma de medidas para tratar de evitar un daño o enfermedad, constituye el eje de cualquier programa de control e incluye el mantenimiento de la calidad del agua; reducción en las diferentes fuentes de estrés como son bajos niveles de oxígeno, presencia de temperaturas extremas, refuerzo o intercambio paulatino de productos de consumo; nutrición adecuada; desarrollo de cepas resistentes; desarrollo de vacunas para protección inmunológica; manipulación ambiental; regulaciones tanto nacionales como internacionales para la importación; y exportación de fauna exótica a lugares de cultivo; y profilaxis química.
- 3) El **tratamiento**, que es el conjunto de cuidados para atacar a las enfermedades, es usualmente en forma de quimioterapia posiblemente combinada con alguna medida preventiva. El control químico se considera como la última instancia en el control de las enfermedades (Sinderman y Lightner, 1988).

Para hacer posible la detección de enfermedades producidas por estos microorganismos en los camarones peneidos, existen tres procedimientos básicos, que son:

- a) Los muestreos periódicos por medio de histopatología de los organismos o poblaciones en cultivo.
- b) El análisis de muestras directas por microscopía fotónica o electrónica, por técnicas de histopatología (preparaciones húmedas o permanentes) y análisis molecular.
- c) La aplicación de bio-ensayos en una población de organismos posiblemente contaminados con una especie utilizada como bioindicador, combinando así, los

muestreos directos y examen a éstos últimos haciendo evidentes los signos de infección (Lightner y Redman, 1992).

Con referencia a la enfermedad de las manchas blancas sobre el exoesqueleto en *Penaeus monodon* y *P. japonicus* y que surge a principios de la década de los años 90 en diferentes lugares de Asia, ésta es reportada bajo diferentes nombres pero con cuadros histopatológicos similares (Peng *et al.*, 1998). En Japón, se reporta como virus nuclear en forma de bastón de *Penaeus japonicus* (RV-PJ) por Inouye, *et al.*, Momoyama, *et al.* Nakano *et al.* y Takahashi, *et al.* en 1994; en China, como baculovirus de la necrosis hipodérmica y hematopiyética (HHNBV) por Cai, *et al.* en 1995 y por último, Wongteerasupaya, *et al.* en 1995 lo reporta como baculovirus sistémico del ectodermo y mesodermo (SEMBV) en Tailandia. En México, esta enfermedad surge en las costas del Pacífico en el año de 1999 y se le conoce como el Síndrome de la Mancha Blanca (White Spot Syndrome Virus, WSSV) (Gómez, *et al.* 2001).

Debido al auge que ha cobrado recientemente el cultivo intensivo de camarones, se ha incrementado también, el interés en la patobiología de estos crustáceos. Los organismos patógenos y los diferentes tipos de enfermedades que ellos producen se consideran responsables, en muchos casos, del fracaso en los cultivos comerciales. Por otra parte, se reconoce también que, si bien en la naturaleza las enfermedades infecciosas constituyen la segunda causa de mortalidad de estos crustáceos después de la depredación y de las variaciones críticas en los factores ambientales, en la acuicultura representan el factor limitante más importante después de los requisitos nutricionales y reproductivo (Sindermann, 1990).

## 1.1 Antecedentes

La patología de camarones inicia hace unos 30 años. Muchos de los primeros autores en esta área utilizaron métodos de diagnóstico simples para describir el primer conocimiento de la enfermedad y los agentes que la causaban, en camarones del medio silvestre, semi-silvestre y cultivados. En las décadas de los años 60, 70 y 80, se aplicaron métodos microbiológicos clásicos en el desarrollo de la patología de camarones determinando agentes causantes de vibriosis, enfermedades propias del exoesqueleto y ciertas fungosis (Kusada y Watada, 1969; Egusa y Ueda, 1972; Cook y Lofton, 1973; Lewis, 1973; Lightner y Lewis, 1975; Austin y Austin, 1987; Nakamura *et al.*, 1994).

En las primeras publicaciones que describían las enfermedades de los camarones, los autores utilizaban métodos de diagnóstico relativamente simples, como la observación de preparaciones húmedas de tejidos enfermos por medio de microscopía de luz o contraste de fases (Sprague, 1950; Iversen y Manning, 1959; Ishikawa, 1966, 1967; Anderson y Conroy, 1968; Cook, 1971; Egusa y Ueda, 1972; Overstreet, 1973; Johnson *et al.*, 1973; Lightner y Fontaine, 1973; Couch, 1974a, b; Barkate *et al.*, 1974; Johnson, 1975; Lightner, 1975). Por otra parte, la histología, con sus varios métodos de tinción, generales y particulares para cada uno de los grupos de parásitos y la microscopía electrónica de transmisión, fueron introducidas en los años 70 para el diagnóstico de enfermedades (Baxter *et al.*, 1970; Sparks y Lightner, 1973; Lightner, 1975; Brock y Lightner, 1990 a yb).

A través del tiempo, se han descrito varias enfermedades virales en crustáceos, no sólo de camarones peneidos de importancia comercial. Los trabajos de virología en peneidos comienzan con Couch (1974 a, b), quien utilizó microscopía electrónica de transmisión para determinar que los cuerpos tetraédricos, hasta el momento inusuales, descubiertos por exámenes directos del hepatopáncreas en *Farfantepenaeus duorarum* y *F. aztecus*, eran la causa de la infección de los túbulos hepatopancreáticos por un cuerpo de inclusión producido por una especie de baculovirus, éste fue el primer virus en ser descubierto en un camarón peneido y se le asigna el nombre de *Baculovirus penaei* (Lightner y Redman, 1998).

El virus del síndrome de la mancha blanca, se detectó en 1993 en Asia. En ese momento, se habían reportado enfermedades de origen viral con mortalidades acumulativas de hasta el 80% en las granjas de cultivo de China, Japón, Corea y Tailandia (Inouye *et al.*, 1994, 1996; Nakano *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995) y más recientemente en Indonesia, Taiwán y la India (Chen, 1995; Chou *et al.*, 1995; Rosenberry, 1995; Wang *et al.*, 1995; Winarno, 1995; Lightner, 1996; Lo *et al.*, 1997; Krishna *et al.*, 1997).

Estas enfermedades tenían características muy similares entre ellas, la principal, la presencia de manchas blancas sobre la cutícula, las cuales fueron atribuidas, en ese momento, a cuatro diferentes virus: el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Baculoviral (Baculoviral Hypodermal & Haematopoietic Necrosis Virus, **HHNBV**) por Huang *et al.* (1994); el Virus Ovoide Alargado de *Penaeus japonicus* (Rod-shapes Virus, **RV-PJ**) por Inouye *et al.* (1994) y Takahashi *et al.* (1994); el Baculovirus Sistemico Ectodermal y Mesodermal (Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus, **SEMBV**) por Wongteerasupaya *et al.* (1995) y el Baculovirus de la Mancha Blanca (White Spot Baculovirus, **WSBV**) por Wang *et al.* (1995), determinando posteriormente que se debía a diferentes cepas del mismo agente viral (Durand *et al.*, 1996). Todos estos virus se consideraron dentro de la Familia Baculoviridae y a la subfamilia de los baculovirus no ocluidos, los Nudibaculovirinae (Francki *et al.*, 1991) cuya ubicación es ahora cuestionada (Kasornchandra y Boonyaratplain, 1998).

Para América en 1995, incluyendo las islas del Archipiélago de Hawai, se habían identificado ocho especies de virus o tipos virales muy estrechamente relacionados que producían enfermedades, cuatro de ellos afectando a una o más especies de camarones cultivados. Estos son: *Baculovirus penaei*, (**BP**); el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, **IHHNV**); el Parvovirus hepatopancreático (Hepatopancreatic virus, **HPV**); el picornavirus del síndrome de Taura (Taura syndrome virus, **TSV**); el virus tipo Reo III (Reo-like virus III, **REO-III**); el virus de la vacuolización del órgano linfoide (Lymphoid organ vacuolization virus, **LOVV**); el rhabdovirus de camarones peneidos (Rhabdovirus of penaeid shrimp, **RPS**); y finalmente, el iridovirus de camarones (Rhabdovirus of penaeid shrimp, **IRDO**) (Lightner *et al.*, 1997). A finales de ese mismo año, se detectaron por primera vez en

América el virus de la cabeza amarilla (Yellow head virus, **YHV**) y el virus del síndrome de la mancha blanca (White spot syndrome virus, **WSSV**) originarios del continente asiático, sumando entonces, solo en América, diez tipos virales diferentes que afectan a la industria camaronícola.

Wang *et al.* (1995), purificaron el virus de la mancha blanca, describieron su genoma y dieron sus características ultramicroscópicas. Compararon las diferencias morfológicas de este virus con el de virus de la necrosis baculoviral de la glándula del intestino medio (BMN), nombrando a esta cepa PmNOBIII.

En 1996, Inouye *et al.*, proporcionaron las características ultraestructurales y morfometrías de lo que llaman virus nuclear ovoide de *Penaeus japonicus*, clasificándolo dentro de los Nudibaculovirinae, una subfamilia de la familia Baculoviridae, y lo redesignan como viremia aguda de los peneidos. Chang *et al.* (1996), realizaron una infección experimental describiendo el comportamiento de ésta a nivel tisular, concluyeron que la hibridación *in situ* fue el proceso más eficiente para la determinación de la presencia en los órganos afectados en comparación con otras técnicas de diagnóstico. Durand *et al.* (1996), realizaron infecciones experimentales a *L. vannamei* y *L. stylirostris* con material viral de *P. monodon* provenientes de Tailandia, analizaron los viriones resultantes por medio de microscopía electrónica de transmisión y dieron las características morfológicas, aplicaron la técnica de hibridación *in situ* para determinar los tejidos afectados, caracterizando cuatro fragmentos por medio de electroforesis en gel de agarosa.

Lu *et al.* (1997), infectaron camarones provenientes del Hemisferio Occidental (*L. vannamei* y *L. stylirostris*) con inóculos de camarones infectados. Mientras tanto, Wang *et al.* (1997a), analizaron poblaciones silvestres de *Metapenaeus ensis*, y las compararon histológicamente con *P. monodon* concluyendo que existe similitud de la enfermedad con otros huéspedes, determinaron que la proliferación de los viriones se lleva a cabo dentro del núcleo de las células posibilitando una infección, vertical en las poblaciones durante el desove; *Metapenaeus ensis* no presentó las manchas blancas en el exoesqueleto presentando organismos asintomáticos.

Wang *et al.* (1997b), proporcionaron las características de la enfermedad de las manchas blancas con base en estudios histopatológicos y de microscopía electrónica de interferencia y microscopía electrónica de barrido, por último, dan las morfometrías de los cuerpos de inclusión y viriones, concluyendo que el factor que desencadena la aparición de la enfermedad son los niveles de amonio en el medio. Lightner *et al.* (1997), reportaron el primer caso de WSSV en el hemisferio occidental a finales de 1995 en *L. setiferus* muestreado en las costas de Texas, y más tarde, Lightner *et al.* (1997) y Nunan *et al.* (1998), mencionan la importancia del movimiento de los camarones peneidos a nivel internacional. Durand *et al.* (1997), proporcionaron las características morfológicas de los viriones así como las alteraciones a nivel histológico de los cuerpos de inclusión de WSSV a nivel ultraestructura. Lo *et al.* (1997), realizaron pruebas de detección y tropismo de cada uno de los diferentes tipos tisulares de *P. monodon*, haciendo énfasis en los órganos reproductores. Karunasagar y Karunasagar (1997), describieron las características morfológicas externas y la histopatología de *P. monodon* en organismos infectados por WSSV originarios de la India y reportando las poblaciones de bacterias asociadas con esta virosis. Nunan y Lightner (1997), desarrollaron una prueba genética para la identificación de WSSV a partir de secuencias de *Baculovirus penaei* y *Monodon baculovirus*. Flegel (1997), realizó un trabajo retrospectivo de cinco de los virus más importantes que producen enfermedades en *P. monodon*.

El año de 1998 y debido a la alta frecuencia de mancha blanca en los sistemas de producción a nivel mundial, se da un incremento en la investigación acerca de WSSV, resultando ser la época en la cual existen más trabajos publicados sobre el tema. Kasornchandra y Boonyaratpalin (1998), desarrollaron el primer cultivo de tejidos a partir de *P. monodon*, para el análisis de la patogenicidad del Virus de la Mancha Blanca (White Spot Syndrome Virus, **WSSV**) probándolo en diferentes especies de crustáceos, determinando alteraciones histológicas y tiempo de infección en cada una de éstas. Sahul *et al.*, (1998) realizaron estudios sobre patogenicidad y métodos de detección por medio de inmunología.

Lo *et al.* (1998), desarrollaron una PCR a partir de la región más conservada del virus de WSSV, dando cuatro niveles de infección. Suppamattaya *et al.* (1998), llevaron a cabo una transmisión experimental de WSSV obtenido de *P. monodon* en *Portunus*

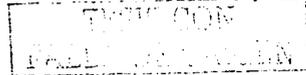
*pelagicus*, *Scylla serrata* y *Acetes* sp., mediante inyección, ingestión e inmersión; donde se observan infecciones con diferentes porcentajes de mortalidad. Kanchanaphum *et al.* (1998), realizaron una infección experimental de WSSV en *Sesarma* sp., *Scylla serrata* y *Uca pugilator* que colocan a coexistir con *Penaeus monodon*. Mohan *et al.* (1998), reportaron las características histopatológicas de los camarones que muestran los signos externos macroscópicos de WSSV con cuerpos de inclusión intranucleares del Virus de la Cabeza Amarilla (Yellow Head Virus, YHV) y viceversa, durante la epizootia de 1994 en la India, sugiriendo una infección dual. Nadala y Loh (1998), analizaron tres diferentes cepas de WSSV purificado provenientes de Indonesia, China y los Estados Unidos, la comparación es morfológica, bioquímica y genómica utilizando microscopía electrónica, electroforesis, western blot y polimorfismo de los fragmentos de restricción.

Nadala *et al.* (1998), purificaron virus de lo que llaman baculovirus chino (CBV) de *P. japonicus* moribundos obtenidos en China y caracterizándolo morfológicamente. Kou *et al.* (1998), observaron la predominancia del WSSV en los diferentes tipos de tejidos camarones y cangrejos y dan la prevalencia de los cuerpos de inclusión en los tipos tisulares. Karunasagar y Karunasagar (1998), resaltaron la importancia de las pruebas moleculares y PCR en el diagnóstico de varias enfermedades que atañen a los camarones peneidos. Chang *et al.* (1998a), aplicaron técnicas de hibridación *in situ* a diferentes organismos de la fauna carcinológica de Taiwán a *Trachipenaeus curvirostris*, *Metapenaeus ensis*, *Exopalaemon orientalis*, *Machrobrachium* sp., *Procambarus clarkii*, *Portunus sanguinolentus*, *Charybdis granulata*, *Panulirus versicolor* and *P. penicillatus*, determinando el tipo tisular afectado de cada uno de éstos.

Chang *et al.* (1998b), realizaron ensayos sobre el efecto que tiene el WSSV en juveniles de *P. monodon* utilizando diferentes técnicas para inactivar este virus. Kasornchandra *et al.* (1998), compararon los cambios microscópicos a nivel histopatológico en camarones colectados en varias localidades de Asia. Peng *et al.* (1998), analizaron por medio de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (Polymerase Chain Reaction, PCR, poblaciones de larvas, postlarvas, juveniles y adultos de *Macrobrachium rosenbergii* y lo comparan con *P. monodon*. Chou *et al.* (1998), infectaron a juveniles de *P. monodon* y *P. japonicus* y postlarvas de *P. penicillatus* de forma oral y por contacto de

extractos de *P. monodon* y *P. Japonicus*, la mortalidad acumulada en todos los experimentos es del 100% en un periodo de 4 a 6 días.

Sudha *et al.* (1998), compararon tres cepas diferentes de WSSV clasificando las manifestaciones clínicas en tres niveles: sub-agudo, agudo, hiper-agudo. Kim *et al.* (1998), confrontaron la secuencia del WSBV con otros virus parecidos y determinan que es un nuevo virus. Itami *et al.* (1998), dan las tasas de sobrevivencias de organismos alimentados con petidoglucanos, observandose una baja en la tasa de mortalidad. Chanratchakool y Limsuwan (1998), monitorearon la población postlarvas de camarón a las cuales se administra formalina para ser usada como prevención del WSSV. Wang *et al.* (1998a 1998b y 1998c), desarrollaron una nueva prueba diagnóstica utilizando hibridación *in situ* en genes para la identificación de WSD utilizando la técnica de amplificación polimórfica de DNA; más tarde, compararon seis aislados de diferentes regiones geográficas, utilizando a juveniles de *Farfantepenaeus duorarum* y postlarvas de *L. vannamei*, determinando que el inóculo de Texas fue el más virulento de todos ellos, pues la mortalidad de los organismos expuestos a este inóculo fueron los que más rápido murieron.



En 1999, Rajendran *et al.*, realizaron un trabajo en el cual inoculan diferentes especies de crustáceos marinos y de agua dulce originarios de la India y observan las mortalidades en cada una de las especies. Tapay *et al.* (1999), desarrollaron primers para PCR para la identificación de material genético de WSV de varias localidades alrededor del mundo. Chen y Wang (1999), establecieron líneas de cultivo de tejidos de ovario, corazón, órgano linfoide, hemocitos periféricos de *P. monodon*, *P. japonicus* y *P. penicillatus* para determinar la susceptibilidad a WSSV y YHV. Lo *et al.* (1999), trabajaron siete diferentes muestras de WSSV de la colección del Dr. Lightner de la Universidad de Arizona determinando el parentesco de estas muestras.

En el 2000, Hammed *et al.*, compararon la susceptibilidad de *Macrobrachium rosenbergii*, *M. idella* y *M. lamarrae* con *P. indicus* y *P. monodon*, determinando que *M. rosenbergii* es el que presenta una tolerancia a la infección viral. Hulten *et al.* (2000a), analizaron el genoma del WSSV y lo comparan con los virus pertenecientes a la Familia Baculoviridae y determinan que es un virus de reciente origen que pertenece a un nuevo

género (Whispovirus) de la Familia Baculoviridae o un miembro de una Familia enteramente nueva, posteriormente Hulten *et al.* (2000b), identifican dos proteínas de los viriones de WSSV. Nadala y Loh (2000), desarrollaron un método de nitrocelulosa para Dot-blot e identificar WSSV y YHV como una prueba rápida de diagnóstico de camarones infectados. Tsai *et al.* (2000a), caracterizaron un gen de WSSV, sugiriendo que con base en un análisis filogenético y alineación de secuencias, el gene puede ser el resultado de la fusión de un gene tipo celular TK y un tipo celular TMK, pudiéndose aprovechar como un gene marcador de WSSV. Tsai *et al.* (2000b), realizaron un análisis transcripcional de la ribonucleótido-reductasa de los genes de WSSV. Villarreal *et al.* (2000), hacen un estudio de las estrategias del ciclo de vida virales para provocar enfermedades. Tang y Lightner (2000), desarrollan un método de cuantificación del genoma de WSSV por medio de PCR.

En el 2001, Hossain *et al.*, aplicaron la técnica de PCR para la determinación de la enfermedades de WSSV en fauna carcinológica asociada a las granja de cultivo de camarones peneidos de las costas de la India, indicando que éstos son asintomáticos pero portadores del virus. Hammed *et al.* (2001), infectaron dos especies de cangrejos de agua dulce, determinando la alta susceptibilidad de estas tal como los camarones peneidos. Hulten *et al.* (2001a y b), realizan trabajos de genómica analizando la secuencia del gen de WSSV así como la estructura de la proteína VP28, involucrada con este virus. Finalmente, Liu *et al.*, (2001) hacen un análisis filogenético y la caracterización de una proteína kinasa del WSSV.

Hammed *et al.* (2002), realizan investigaciones acerca de *Artemia* sp. como posible vector de WSSV a *Penaeus indicus*.

En México, el estudio de las enfermedades de camarones peneidos en cultivo se inicia a principios de la década de los años 90. De manera oficial, se constituye el Comité de Sanidad Acuícola, el cual depende del Comité Nacional de Normalización de Pesca Responsable conformado por grupos de investigación, el gobierno federal y los productores del país. Desde la creación de este grupo, se han expedido normas relacionadas con la sanidad acuícola de camarones comerciales, si no de la flora y fauna relativa a la acuicultura del país, como lo son: la Norma Oficial Mexicana **NOM-010-PESC-1993**, la cual establece los requisitos sanitarios para la importación de organismos

acuáticos; la Norma Oficial Mexicana **NOM-011-PESC-1993**, que regula la aplicación de cuarentenas a efecto de introducir enfermedades exóticas al país; la Norma Oficial Mexicana **NOM-020-PESC-1994**, que acredita las técnicas de identificación de agentes patógenos y finalmente la Norma Oficial Mexicana **NOM-022-PESC-1994**, que establece las regulaciones de higiene y su control (Hernández, 1995).

Jiménez (1999), editó un atlas de las enfermedades de camarones peneidos, el cual es uno de los primeros trabajos a nivel nacional que tratan no solo de WSSV sino de varias enfermedades de diferentes tipos en camarones de importancia comercial. Gómez *et al.* (2001), dieron las características de las diferentes enfermedades que atacan a la industria camaronícola en México.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **1.2 Características del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (White Spot Syndrome Virus).**

La bibliografía nos señala los siguientes:

### **Datos clínicos de la enfermedad y su morfogénesis.**

Los primeros rasgos de la sintomatología son: la baja de consumo en el alimento, la letargia, el reblandecimiento de la cutícula; así como una coloración rosada originada a la excitación de los cromatóforos y la presencia de manchas blancas de 0.5 a 2.0 mm de diámetro en la superficie de la cutícula y otros órganos internos.

De manera histológica se determinó la presencia de hipertrofia nuclear, la marginación de la cromatina y la acumulación intranuclear de los viriones. Los núcleos contienen material granular y fibrilar localizado de manera central, presentándose fragmentos circulares o lineares de la membrana, se observa que los cuerpos de inclusión son eosinófilos y progresivamente basófilos. El agente viral tiene de 80 a 120 X 275 a 360 nm (Durand *et al.* 1997). Los tejidos blanco que son afectados son los tejidos epitelial y conjuntivo de todo tipo, particularmente el de las branquias y estómago (Inouye *et al.*, 1994; Chen, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Durand *et al.* 1996, 1997). Wongteerasupaya *et al.*, 1995, concluyeron entonces que la infección está limitada a los tejidos de origen embrionario mesodérmico y ectodérmico de los camarones.

### **Ultra estructura**



El virus está típicamente caracterizado por una extensión apical que lo envuelve, algunas veces se observa hacia un lado de la partícula. La nucleocápside despliega una apariencia superficialmente segmentada, Cada segmento parece estar formado por sub-unidades de 8 nm de diámetro, los cuales están arreglados en dos filas paralelas.

El cilindro representando la nucleocápside es cerrado en uno de los extremos por un pequeño segmento que forma una ligera terminal redondeada y en el extremo opuesto es cuadrado (Fig. 1a). En algunas nucleocápsides degradadas se observa una apariencia

rota o quebrada y un área clara, de aproximadamente 24 nm de grosor, en uno de los extremos. Los segmentos están parcial o completamente separados del resto de la nucleocápside formando un anillo en uno de los extremos. El contenido de ésta, parece ser un material filamentoso relacionado durante la degradación de la nucleocápside

El virión es ovoide de unos 250 x 100 nm. La envoltura es de unos 6 o 7 nm de grosor y tiene una estructura trilaminar en la unidad de la membrana.

TESIS CON  
FALLA DE LENGUAJE



**Figura 1a.-** Micrografías electrónicas de partículas de WSSV teñidas negativamente. A, Aislado Indonesio; B, Aislado Norteamericano y C, Aislado Chino. Las escalas de las micrografías indican 100 nm. 1, Virus mostrando la característica extensión (flecha) de la envoltura en el ápice de la partícula; 2, Localización inusual de la extensión de la envoltura en la parte media de la partícula; 3, Una nucleocápside presentando una extremidad cuadrada y otra redondeada con una apariencia segmentada. Los segmentos están formados por dos series de unidades alineadas arregladas en hileras regulares (flechas) La segunda nucleocápside es parcialmente hinchado (flecha); 4, Nucleocápside exhibiendo un una apariencia de reventarse a lo ancho formado por unidades dispuestas regularmente. Un área clara (flecha) de una de las extremidades representando la orientación de la nucleocápside degradada; 5, La nucleocápside degradada es fracturada al nivel de la segmentación (flecha); 6, Nucleocápside con un segmento objetivo mostrando su forma redondeada. (A - C, tomado de Nadala y Loh, 1998; 1 - 6, tomado de Durand *et al.*, 1997)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

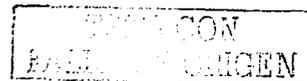
### 1.3 Objetivos

#### Objetivo general.-

Demostración de las alteraciones histológicas producidas por los cuerpos de inclusión del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en tejidos y órganos de camarones peneidos a través de técnica histológica convencional y técnicas moleculares.

#### Objetivos particulares.-

- ✓ Identificar los cuerpos de inclusión y alteraciones histológicas que produce el WSSV, aplicando diferentes técnicas de tinción en camarones peneidos, *Litopenaeus vannamei*.
- ✓ Identificar el material genético viral del WSSV aplicando técnicas moleculares en camarones peneidos, *Litopenaeus vannamei*.
- ✓ Demostrar las alteraciones histológicas producidos por los cuerpos de inclusión del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en los tejidos y órganos en camarones peneidos, *Litopenaeus vannamei*.
- ✓ Establecer las ventajas y desventajas de cada una de las técnicas histológicas convencionales y moleculares para su implementación en campo y laboratorio.



## **2.0 Material y Método**

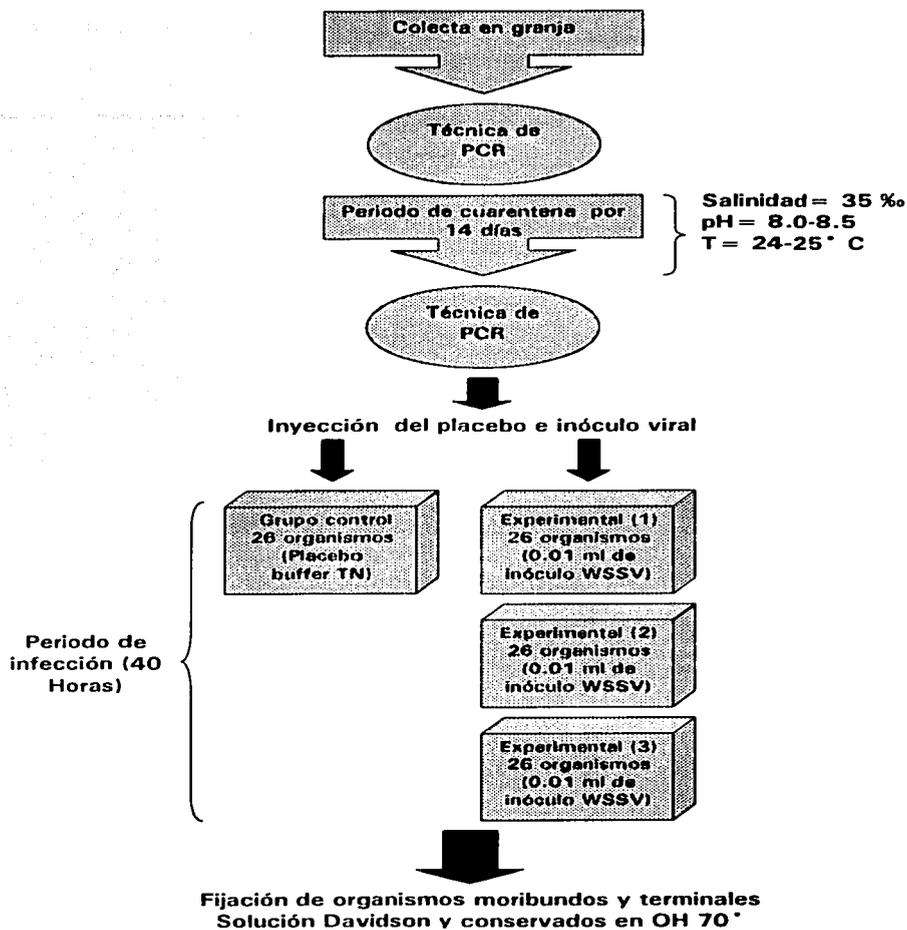
### **2.1 Colecta y aclimatación de los organismos**

Se llevaron a cabo dos colectas de camarones de la especie *Litopenaeus vannamei* en granjas camaronícolas del Estado de Sinaloa, la primera, en la región de Culiacán, para la obtención de organismos positivos a WSSV para elaborar un inóculo viral y la segunda, en la región de Mazatlán, para obtener organismos sanos, los cuales se infectaron posteriormente con el inóculo viral. Ambas colectas fueron procesadas en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) Unidad Mazatlán, en el Estado de Sinaloa, México.

La colecta para obtener material genético viral, se realizó en estanques de una granja camaronícola, en la cual, la población de camarones resultó positiva para WSSV por medio de la técnica de PCR. Los organismos fueron etiquetados y mantenidos en congelación a una temperatura de  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de su procesamiento. Los organismos a infectar, que corresponden a la segunda colecta, con un peso de entre 1.0 y 3.0 g, fueron obtenidos de una granja de cultivo a los que se les tomó una muestra de hemolinfa, procesada posteriormente mediante la prueba de PCR para determinar que estuvieran libres de partículas virales de WSSV. Los camarones fueron dejados en aclimatación por un periodo de 14 días, colocados en acuarios de 40 L a una salinidad de 35 ‰, temperatura de 24-25° C, aireación constante y un pH de 8.0-8.5, con recambio de agua del 40% cada 24 horas, y alimentados con una fórmula comercial de alimento concentrado para camarón; el agua utilizada en los bio-ensayos fue tomada del ambiente marino, filtrada en arena y colocada en tanques de plástico negro con capacidad de 500 L cada uno y aireación constante en un ambiente oscuro para evitar el crecimiento de microalgas.

Al finalizar la aclimatación se tomó nuevamente hemolinfa de los organismos para asegurar que no fueran portadores del material genético viral del WSSV (Diagrama 1).





**Diagrama 1.-** Diseño experimental para la obtención de organismos a procesar histológicamente para la identificación de WSSV.

TRABAJO CON  
FALLA EN COPIA

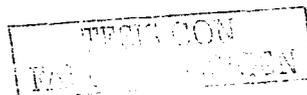
## 2.2 Preparación del inóculo viral

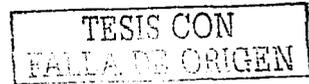
De acuerdo a los trabajos de Brock *et al.* (1995); Hasson *et al.* (1995); Durand *et al.* (1996, 1997) y Overstreet *et al.* (1997), se elaboró un inóculo viral de WSSV a partir organismos juveniles de la especie *Litopenaeus vannamei* en el Laboratorio de Virología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A. C.) Unidad Mazatlán, bajo la coordinación del M. en C. Leobardo Montoya R.

De estos organismos se obtuvieron 27 g de tejidos del cefalotórax (branquias, artrobranquias, pereiópodos, parte distal de pleópodos) separando el hepatopáncreas debido a que este órgano presenta una baja concentración de partículas virales y una alta densidad bacteriana lo que ocasionaría una contaminación del inóculo. Posteriormente, se homogenizaron los tejidos disueltos con buffer TN 1X estéril (Durand *et al.*, 1996, 1997; Hasson *et al.*, 1995) (Anexo I). La suspensión del homogenizado de los tejidos se colocó en una serie de 10 tubos de centrifuga de polipropileno claro estériles con graduación. La centrifugación se llevo a cabo a 10000 g a 4° C por 20 min., el sobrenadante fue filtrado en una malla con apertura de 0.22 µm a una temperatura de 4° C. La proporción tejido: buffer TN fue de 1:4 (Anexo I). El inóculo fue almacenado en alícuotas y congelado a -20 °C hasta antes de ser utilizado en los bioensayos.

## 2.3 Infección experimental

La infección experimental con el virus fue realizada con base a la información de Inouye *et al.* (1996). Los organismos juveniles de *L. vannamei*, fueron inyectados, con una jeringa hipodérmica para insulina, depositando una cantidad de 0.01 ml del inóculo viral en el costado de la unión del segundo y tercer segmento abdominal entre el músculo y la cutícula. Bajo las mismas condiciones de aclimatación, los camarones bajo experimentación fueron un total de 78 organismos, que fueron colocados en tres grupos de 26 organismos por acuario con una capacidad de 40 L cada uno, un último grupo de 26 organismos más fueron colocados en un cuarto acuario y que sirvió como grupo control a los cuales se les inyectó 0.01 ml de Buffer TN 1X a manera de placebo. Estos acuarios se mantuvieron en un área de bio-ensayos del CIAD, A. C..





## **2.4 Fijación y conservación de las muestras**

Los camarones moribundos y los que llegaron a cumplir con un periodo de cuarenta horas (39 organismos totales) fueron procesados histológicamente, desechando a los organismos muertos. Los organismos fueron fijados en solución Davidson por un periodo de 48-60 horas de acuerdo a Bell y Lightner (1988), la cual se inyectó en una relación 1:1 con el peso del organismo y preservados en alcohol 70° neutralizado (pH 7.0-7.5) hasta el momento de su procesamiento histológico. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas para ser incluidas en parafina con punto de fusión de 56-58 °C.

## **2.5 Técnica Histológica**

Se realizaron cortes en un microtomo American Optical modelo 820 Spencer con un grosor de 5 a 7  $\mu\text{m}$  (Ferrer, 1931; Bell y Lightner, 1988; Lightner, 1996; Wang *et al.*, 1997b). Estos cortes fueron seriados para cada uno de los organismos obteniendo de 12 a 15 preparaciones por camarón para que cada uno de los organismos fuera procesado por las diferentes técnicas de tinción. Los primeros cortes para aplicar la técnica de Hematoxilina-Eosina, fueron realizados en el Laboratorio de Histopatología del CIAD, A. C.

Se aplicaron diferentes tinciones: Moreno de Bismark (Lightner, 1996), (Anexo II); Hematoxilina-Eosina (Luna, 1968; Bell y Lightner, 1988; Austin y Austin, 1989; Lightner, 1996), (Anexo III); Hematoxilina-Eosina/Floxina (Luna, 1968; Sheehan and Hrapchak, 1980; Lightner, 1996), (Anexo IV); Técnica de Mallory (Luna, 1968; Sheehan and Hrapchak, 1980), (Anexo V); y la Tinción de Lendrum (Sheehan and Hrapchak, 1980; Austin y Austin, 1989), (Anexo VI).

Para este trabajo se aplicaron cuatro tipos de microscopía, las cuales son: microscopía de campo claro, microscopía de contraste de fases, microscopía de fluorescencia (U-M536 y U-M556 Olympus America Inc.) y microscopía de Nomarsky.

Las laminillas fueron analizadas en un microscopio American Optical, PhaseStar y un microscopio Nikon Alphaphot del Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Una vez identificadas las zonas

con presencia de cuerpos de inclusión y alteraciones histológicas se tomaron fotomicrografías en un equipo Olympus Provis AX70 del Laboratorio de Microcine de la misma dependencia.

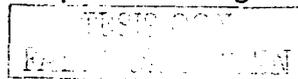
## 2.6 Técnicas Moleculares

Se realizaron dos técnicas moleculares que son la Reacción de la Polimerasa en Cadena y la Hibridación *in situ* ambas en las instalaciones del Laboratorio de Virología del CIAD.

### Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) (Anexo VII).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), es usada para amplificar un segmento o segmentos de ADN que se encuentran entre regiones de una secuencia conocida. Dos oligonucleótidos son usados a manera de "primers" en una serie de reacciones sintéticas que están catalizadas por una ADN-polimerasa. Para este estudio, se utilizaron oligonucleótidos de la casa comercial DiagXotics, Inc. (IQ2000) que se encuentran en un paquete de trabajo. Estos oligonucleótidos tienen típicamente, diferentes secuencias y son complementarias a las secuencias que, primero, se encuentran por arriba o sobre la hebra templada de ADN, y segundo, flanquean al segmento de ADN que está siendo amplificado. Como primer paso, el ADN templado es desnaturalizado por medio de energía calórica en la presencia de un medio rico en exceso de los dos oligonucleótidos y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) (Sambrook *et al.*, 1989).

La reacción o mezcla es enfriada a una temperatura en donde los "primers" de oligonucleótidos se alinean con base a las secuencias patrón, y posteriormente con la ADN-polimerasa. El ciclo o ciclos de desnaturalización, alineación y síntesis del ADN es repetida varias veces. Los productos de un ciclo completo de amplificaciones, sirven como patrón para el siguiente, así los ciclos sucesivos resultan en el doble de ADN como producto total. El producto de esta reacción exponencial, es un segmento de doble cadena de ADN cuyo termino está definido por la terminación 5' del "primer" del oligonucleótido



cuyo largo está definido por la distancia entre los “primers” (Sambroock *et al.*, 1989) (Anexo V).

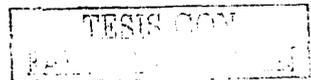
El PCR, tiene ventajas sobre otros métodos que utilizan pruebas de ácidos nucleicos, las cuales tienen una sensibilidad de detección de  $10^4$  a  $10^5$  moléculas en un patrón homólogo. El PCR necesita en promedio 10 moléculas patrón para proveer un resultado positivo (Karunasagar y Karunasagar, 1998).

Para este trabajo, se disectaron los dos pleópodos del primer segmento abdominal de los organismos, primero los organismos del lote experimental y segundo los organismos de cada uno de los acuarios que se sometieron a la infección experimental. A todos ellos se les aplicó la técnica de extracción de DNA, IQ2000 y DTAB/CTAB (Anexo VIII), colocando éste a una temperatura de  $-20$  °C hasta el momento de su procesamiento por PCR. Para la aplicación de la prueba de PCR se utilizó el protocolo IQ2000.

Una vez extraído el DNA de las muestras, se colocaron cada una de las ellas en tubos estériles de 1.5 ml, adicionando la *Taq* Polimerasa y la mezcla maestra de reactivos para colocarlos en el termociclador previamente programado en donde se llevó a cabo el proceso de desnaturalización, alineación y extensión. Este proceso se realizó dos veces y los tiempos para cada uno de los pasos están determinados por la finalidad que se tenga en el trabajo.

Posteriormente se colocaron en un gel de agarosa para correr estas muestras con un marcador y separarlos por pesos moleculares y finalmente hacer la observación en una lámpara de luz ultravioleta (UV). La banda esperada en la observación es de 296 pares de bases que corresponde al peso molecular de WSSV por medio de este kit.

Hibridación *in situ* (Anexo IX)



Se realizaron cortes transversales de los organismos infectados con un grosor de 5  $\mu$ m y se montaron en portaobjetos cargados positivamente. Los cortes fueron desparafinados en 2 pasos de xilol e hidratados con alcoholes graduales seguido por una digestión con proteinasa K. Los cortes fueron calentados a una temperatura de 95 °C por 6

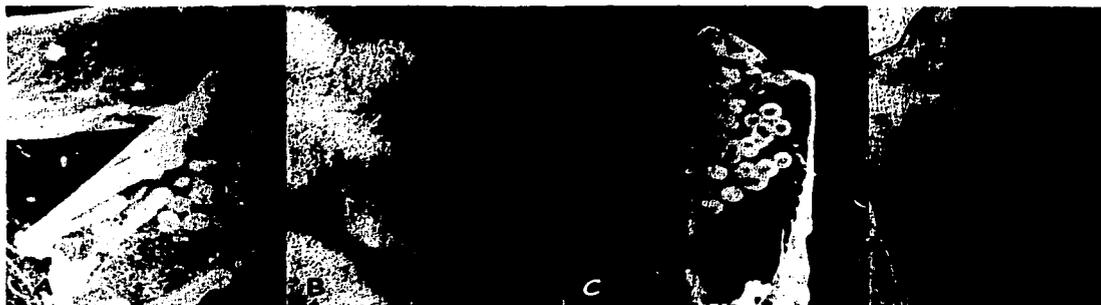
minutos para posteriormente hibridarlos a 42 °C por 24 horas con una sonda de comercial de WSSV (WSBV ShrimProbe DiagXotics, Inc.), posteriormente se realizó una tinción de moreno de Bismark para contrastar la actividad resultante de esta hibridación *in situ*.

Finalmente, las preparaciones histológicas se deshidrataron mediante alcoholes graduales y fueron aclaradas con xilol para ser montadas con resina sintética y tener preparaciones permanentes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.0 Resultados

En este trabajo, la totalidad de los camarones infectados (78 organismos de la especie *L. vannamei*) desarrollaron las características manchas blancas que son claramente visibles en una infección avanzada sobre el exoesqueleto. En la figura 1b, se puede observar manchas ocasionadas por depósitos calcáreos sobre la cutícula del camarón. Estas manchas, que inicialmente son decoloraciones de los cromatóforos subcuticulares, van de una coloración rosa a rojo en las infecciones iniciales, pardo en las infecciones intermedias, tornándose blancas y más evidentes en infecciones agudas. La infección de los animales fue confirmada por medio de pruebas histológicas, observándose infecciones leves y lesiones más agudas, dependiendo del número de células infectadas y el grado de desarrollo de los cuerpos de inclusión en las mismas células, así mismo, a nivel tisular la severidad de la infección estuvo dada por el número de células que se encuentran infectadas, pudiendo observar un mayor o menor número de cuerpos de inclusión.



**Figura 1b.-** Vista general y detalle de las incrustaciones calcáreas sobre la cutícula correspondiente al área del cefalotórax de un juvenil de *L. vannamei*. A) Contraste de un exoesqueleto sano correspondiente a los organismos utilizados como grupo control y un exoesqueleto con incrustaciones calcáreas. B) Incrustaciones de un organismo enfermo. C) y D) Detalle de las incrustaciones de un organismo con infección aguda de WSSV. Microscopía de campo claro en un microscopio de disección.

Otros signos clínicos que se apreciaron incluyen letargia, anorexia, una baja en el consumo de alimento, y de manera general un enrojecimiento en los apéndices y una

coloración rosa en el exoesqueleto provocado por la excitación de los cromatóforos, una decoloración del músculo, principalmente en los paquetes musculares del abdomen, una falta de alimento en el tracto digestivo de esta porción del cuerpo y por último las antenas rojas y quebradizas (Figura 4C). Los cuerpos de inclusión de WSSV en organismos juveniles de *L. vannamei*, son caracterizados por medio de técnica histológica convencional aplicando diferentes tinciones (Hematoxilina-Eosina; Hematoxilina-Eosina/Floxina; moreno de Bismark; Tricrómica de Mallory; Lendrum) y técnicas moleculares (PCR e Hibridación *in situ*). Así como el uso de diferentes tipos de microscopía (Campo claro, Contraste de fases, Fluorescencia).

### 3.1 Técnica Histológica

Los resultados obtenidos a través de la técnica histológica mostraron una alteración de la estructura normal del epitelio subcuticular del estómago, originada por la presencia de cuerpos de inclusión prominentes en diferentes etapas de desarrollo. De acuerdo con el trabajo de Lightner *et al.* (1983), el grado de infección observado en las laminillas histológicas obtenidas de los organismos que se sometieron a la infección experimental, estuvo dentro de los niveles 1 a 4, dado por el número de cuerpos de inclusión intranucleares que se encontraron en el tejido entonces el nivel 1 corresponde a una infección muy liviana; el nivel 2 a una infección liviana; el nivel 3 a una infección moderada y finalmente el nivel 4 a una infección severa. Existen también, cuerpos de inclusión prominentes inmersos en el tejido conjuntivo que une el epitelio con el resto del tejido en la zona del estómago y la parte anterior del tubo digestivo. En el tejido branquial, por medio del uso hibridación del tejido, se observó material genético del virus, intra y extracelular, este último, diseminado entre el tejido, en cuanto a la alteración de la estructura tisular, no se observó de forma aguda pues el número de los cuerpos de inclusión totalmente desarrollados no fue alto.

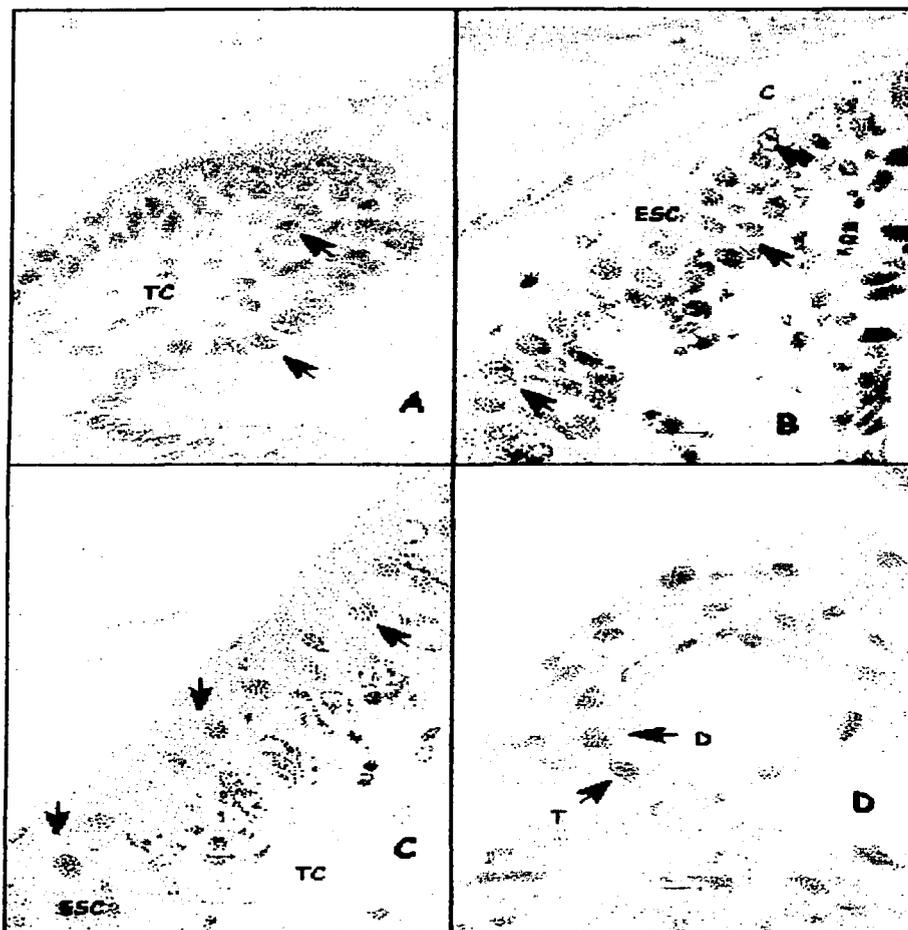
Los 78 organismos que se sometieron a la infección experimental, presentaron las características manchas blancas sobre el exoesqueleto (figura 1b), principalmente sobre el caparazón del cefalotórax, de este total de organismos se procesaron por medio de histología solo 39 organismos pues los demás fueron desechados pues fueron organismos muertos, los cuales no tienen las condiciones anatómicas e histológicas para aplicar

técnica histológica. Los organismos del grupo control, fueron analizados por medio de histología, encontrándose la ausencia de los cuerpos de inclusión, tanto por el uso de histología convencional y molecular. En las preparaciones con la técnica de Hematoxilina-Eosina, se observaron fases diferentes de la infección de WSSV, presentando cuerpos de inclusión intranucleares desde iniciales hasta totalmente desarrollados.

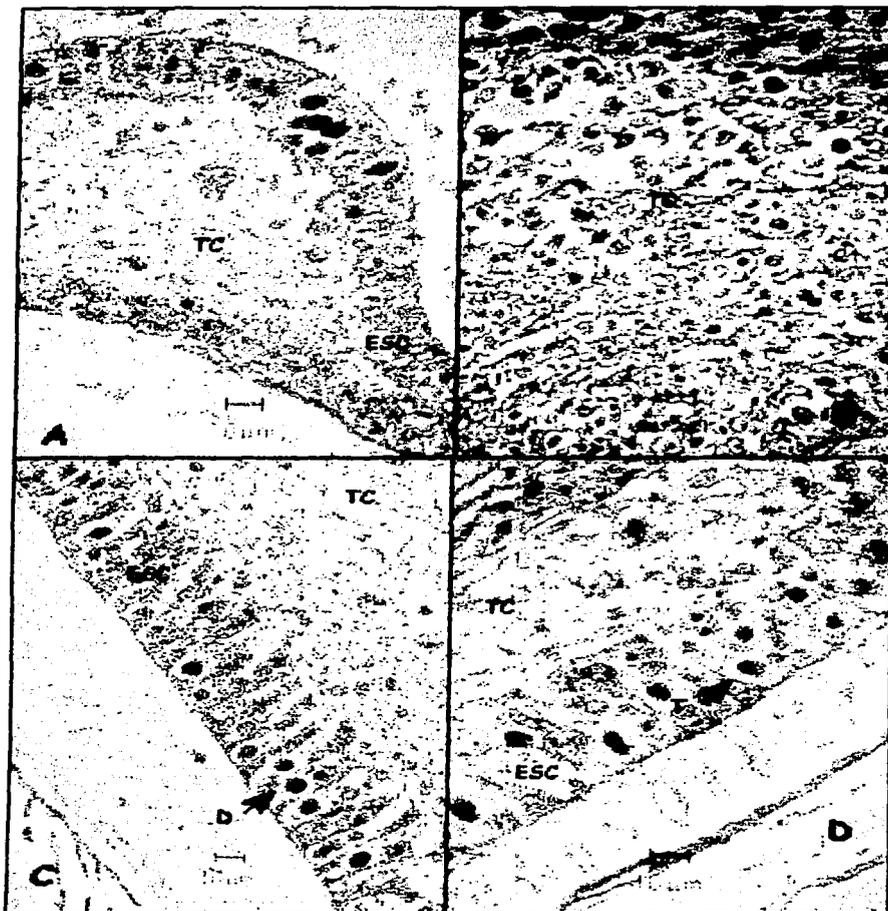
Las fases de inclusión tempranas son abundantes, y se encuentran separadas de la membrana nuclear, la cromatina se presenta marginal en los halos (←) (Fig. 2A y 2B). En la figura 2C, se observan cuerpos de inclusión intranucleares de WSSV totalmente desarrollados (←), las inclusiones intranucleares del WSSV, son eosinófilas en etapas iniciales con una zona clara alrededor del cuerpo de inclusión. Gradualmente se tornan basófilos ocupando al mismo tiempo la totalidad del núcleo presentando una textura granulosa en los núcleos hipertrofiados. Estas inclusiones intranucleares son similares a los cuerpos de inclusión Tipo A que se presentan en el IHNN.

En la figura 2D, se observa un corte de tejido branquial de un juvenil de *L. vannamei* mostrando cuerpos de inclusión en diferentes estadios de desarrollo, estadios tempranos (←T) y totalmente desarrollados (←D) de WSSV. Cuando el nivel de la infección es muy bajo, la diagnosis por medio de histopatología es difícil. Salvo algunas precipitaciones de color azul observadas por la técnica de hibridación *in situ*, en este trabajo no se observaron cambios a nivel tisular originados por la patología en el hepatopáncreas de los organismos infectados, ni tampoco algún otro tejido derivado del endodermo, sin embargo, se observó una alteración en la estructura del epitelio subcuticular del estómago, debida al crecimiento de los núcleos celulares que posteriormente lisan a la célula huésped (Fig. 3A, C y D) y en el tejido conjuntivo asociado a esta estructura (Fig. 3B).

Para evidenciar los cuerpos de inclusión, se utilizó la microscopía de Nomarsky (Fig. 4A y B) en la cual el uso del filtro azul permite evidenciar estos (←) en el epitelio subcuticular y en el tejido conjuntivo, ambos del estómago (Fig. 4A). Con el uso del filtro verde (Fig. 4B), se puede hacer evidente el grado de desarrollo que tienen los que se encuentran en los núcleos, tanto los cuerpos de inclusión tempranos (←T) y los completamente desarrollados (←D), estos últimos producen una lisis total del núcleo celular.



**Figura 2.-** A-D, Fotomicrografías de cortes histológicos de un organismo juvenil de *L. vannamei* infectado con WSSV. A, B, C, Epitelio subcuticular y tejido conjuntivo del estómago; D, tejido branquial. Se muestran células con núcleos degenerados. A, D, Hematoxilina-Eosina; B, C, Hematoxilina-Eosina/Floxina. Microscopía de campo claro. ESC, Epitelio subcuticular; C, Cutícula; TC, tejido conjuntivo; ←D, Cuerpo de inclusión desarrollado; ←T, Cuerpo de inclusión temprano.



**Figura 3.-** A-D Fotomicrografías de cortes histológicos de un organismo juvenil de *L. vannamei* infectado con WSSV. A, B, D, Técnica de Lendrum; C, Hematoxilina-Eosina. Microscopía de contraste de fases. ESC, Epitelio subcuticular; TC, tejido conjuntivo; ←D, Cuerpo de inclusión desarrollado; ←T, Cuerpo de inclusión temprano.



**Figura 4.-** A, B Fotomicrografías de cortes histológicos de un organismo juvenil de *L. vannamei* infectado con WSSV. Microscopía de Nomarsky. A, tejido subcuticular y conjuntivo del estómago teñidos mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina y uso de filtro azul; B, tejido conjuntivo, subcuticular y cutícula del estómago teñidos mediante la técnica de Lendrum y uso de filtro verde. ESC, Epitelio subcuticular; TC, tejido conjuntivo; C, Cutícula; ←D, Cuerpo de inclusión desarrollado; ←T, Cuerpo de inclusión temprano. C, a la izquierda dos camarones sanos con el tracto digestivo con alimento y a la derecha dos camarones enfermos con la excitación de los cromatóforos en la región de los urópodos y la alteración del color del abdomen, así como el tracto digestivo vacío.

En la figura 5, se presentan diferentes campos de cortes histológicos del epitelio subcuticular y tejido branquial de juveniles de *L. vannamei*; en la figura 5A se muestra en detalle los cuerpos de inclusión de WSSV totalmente desarrollados (←); en la figura 5B y 5C, dos panorámicas de tejido epitelial subcuticular y tejido conjuntivo; y en la 5D, se observan dos cuerpos de inclusión a punto de estar totalmente desarrollados (←), así como la cromatina marginal del núcleo.

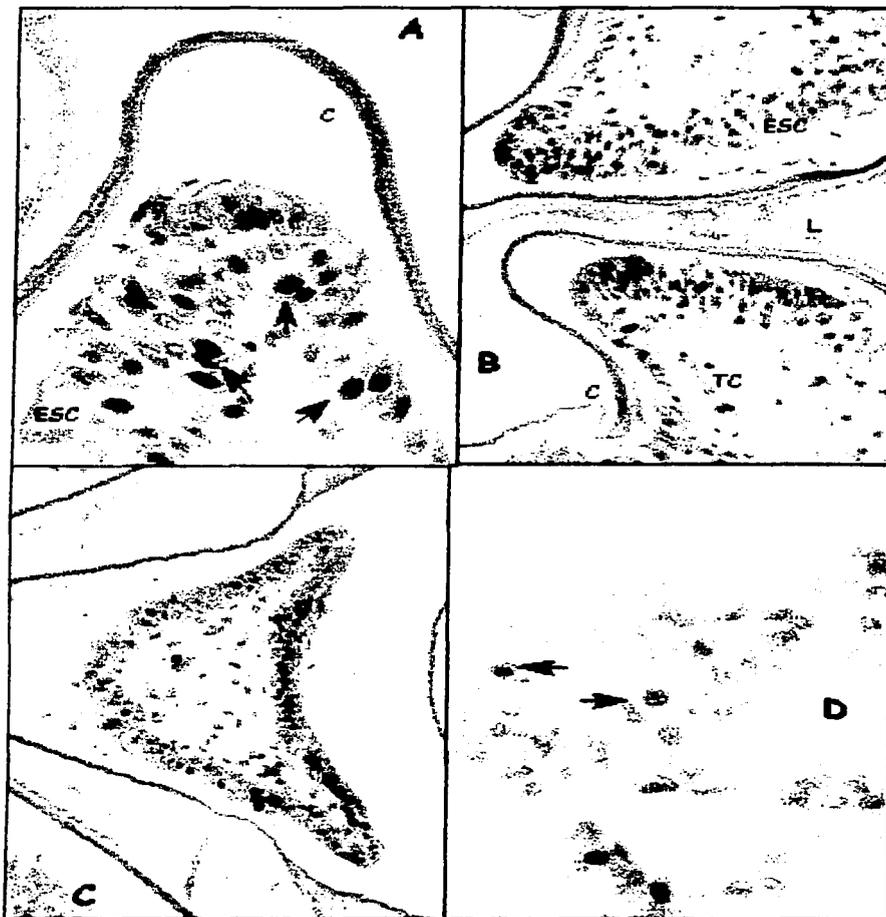
En la figura 6A y 6B, se muestran cuerpos de inclusión en tejido epitelial subcuticular del estómago en fases terminales de desarrollo (←); en la figura 6C, un corte de tejido branquial con cuerpos de inclusión en diferentes estadios de desarrollo.

La tinción monocromática de moreno de Bismark es una técnica en la cual al no haber un contraste de coloración en las estructuras, es difícil establecer la diferenciación celular; en el caso de los cuerpos de inclusión, éstos son evidentes solo cuando están en fases terminales de su desarrollo (Fig. 6D). En el epitelio subcuticular del estómago (←) se pueden observar cuerpos de inclusión terminales, los cuales son más grandes que la dimensión total de las células.

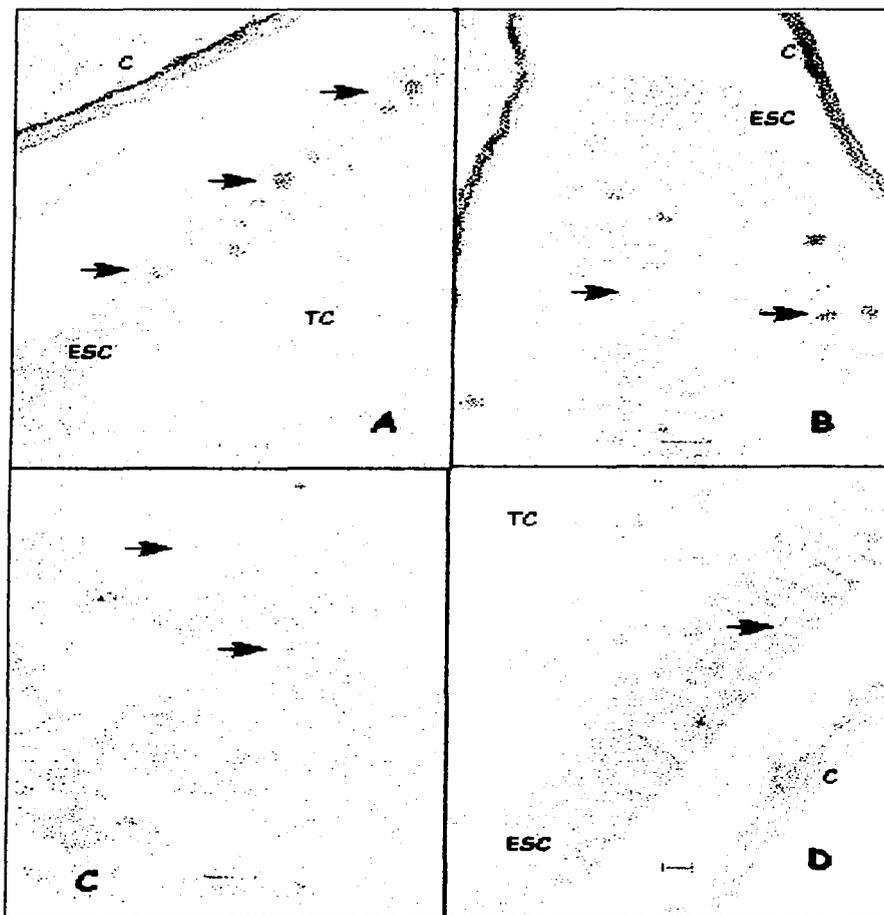
En algunos núcleos hipertrofiados, principalmente del epitelio subcuticular del estómago, fueron detectados cuerpos de inclusión en proceso de formación en el plasma del núcleo, lo cual indica que la multiplicación viral se lleva a cabo en el interior del núcleo celular, para posteriormente liberar viriones al resto del tejido.

En la totalidad de las preparaciones, no se observaron cuerpos de inclusión en la zona del citoplasma celular, hecho que nos confirma que es un virus formado de DNA y que se sintetiza estrictamente en el núcleo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 5.-** A-D, Fotomicrografías de cortes histológicos de un organismo juvenil de *L. vannamei* infectado con WSSV. Técnica de Lendrum; Microscopía de campo claro. A, Detalle del epitelio columnar subcuticular de la región del estómago con cuerpos de inclusión completamente desarrollados (←); B, C, Panorámicas de dos zonas del epitelio subcuticular y tejido conjuntivo del área del estómago en el que se observan cuerpos de inclusión en diferentes fases de desarrollo; D, Detalle de un corte de ramas branquiales con cuerpos de inclusión completamente desarrollados (←). ESC, Epitelio subcuticular; TC, tejido conjuntivo; C, Cutícula; L, Lumen del estómago.



**Figura 6.-** A-D, Fotomicrografías de cortes histológicos de un organismo juvenil de *L. vannamei* infectado con WSSV. A, B, C, Técnica Tricrómica de Mallory; A-B, Detalle del epitelio subcuticular del estómago; C, Tejido branquial, ambos con cuerpos de inclusión en diferentes fases de desarrollo (←). D, Tinción monocromática de moreno de Bismark; Microscopía de campo claro. ESC, Epitelio subcuticular; TC, tejido conjuntivo; C, Cutícula.

En la figura 7A, se presenta una vista panorámica de un corte transversal del estómago de *L. vannamei*, teñido con Hematoxilina-Eosina/Floxina con microscopía de fluorescencia utilizando filtro verde (Cubo modular de fluorescencia Olympus U-MWU), en donde se muestra la actividad de la floxina haciendo evidente de manera especial a la cutícula que recubre el epitelio subcuticular. En la 7B, se exhibe un detalle de los cuerpos de inclusión intranucleares de WSSV desarrollados totalmente (←) (Cubo modular de fluorescencia Olympus U-MNBV).

Técnica	Ventajas	Desventajas
<b>Hematoxilina - Eosina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Provee una visión panorámica de la muestra.</li> <li>* Costo bajo.</li> <li>* Tiempo de procesamiento de 12-24 horas.</li> <li>* Manejo de la técnica en lugares sin condiciones particulares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* El material genético no se observa hasta formar los cuerpos de inclusión.</li> <li>* Poco específica en la identificación entre las diferentes especies de virus.</li> <li>* El número de organismos analizados depende de la cantidad de equipo y personal calificado.</li> </ul>
<b>Hematoxilina-Eosina/Floxina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* En microscopía de campo claro, contraste de fases y Nomarsky, da los mismos resultados que H-E.</li> <li>* En microscopía de fluorescencia, da información de las estructuras que reaccionan con la floxina.</li> <li>* Costo bajo.</li> <li>* Tiempo de procesamiento 12-24 horas.</li> <li>* Manejo de la técnica en lugares sin condiciones particulares.</li> </ul>	
<b>Técnica de Mallory</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Tiempo de procesamiento 12-24 horas.</li> <li>* Costo bajo.</li> <li>* Manejo de la técnica en lugares sin condiciones particulares.</li> </ul>	
<b>Técnica de Lendrum</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Evidencia de manera clara los cuerpos de inclusión en todos sus estadios.</li> <li>* Manejo de la técnica en lugares sin condiciones particulares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Costo ligeramente elevado con relación a otras técnicas convencionales.</li> <li>* Tiempo de procesamiento 48-80 horas.</li> <li>* Poco específica en la identificación entre las diferentes especies de virus.</li> </ul>
<b>Moreno de Bismark</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Costo bajo.</li> <li>* Tiempo de procesamiento 12-24 horas.</li> <li>* Manejo de la técnica en lugares sin condiciones particulares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Se necesita de mucha experiencia en el microscopio para la identificación de los cuerpos de inclusión.</li> <li>* Imágenes monocromáticas sin contraste.</li> <li>* Poco específica en la identificación entre las diferentes especies de virus.</li> </ul>
<b>Hibridación <i>in situ</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Tiempo de procesamiento 12-24 horas.</li> <li>* El material genético se observa sin la formación de los cuerpos de inclusión.</li> <li>* Altamente específica en la identificación de cada especie viral.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Costo elevado.</li> <li>* Utilización de recursos humanos calificados.</li> <li>* Manejo de la técnica en lugares estériles y aislados.</li> </ul>

**Tabla 2.- Cuadro comparativo de las técnicas histológicas empleadas en la identificación de WSSV.**

TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

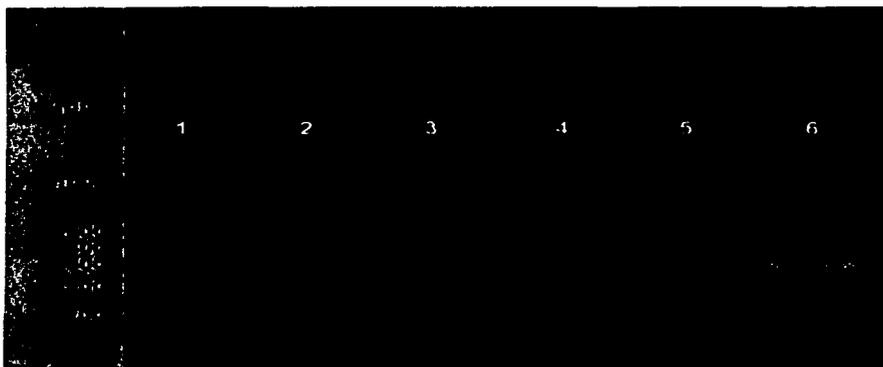
### 3.2 Técnicas Moleculares

#### Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los organismos del grupo control (26 camarones) y los infectados experimentalmente que llegaron a cumplir con las 40 horas post-infección (39 camarones), fueron analizados por medio de la técnica de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR).

Como primer paso se analizaron los organismos del grupo control y como segundo paso, los organismos del grupo de experimentación, esto últimos resultaron ser positivos posterior a la infección por inyección.

En la figura 8, se muestra los resultados de diferentes corrimientos de los productos de la PCR para material genético de camarones peneidos los cuales fueron infectados experimentalmente, con los resultados descritos en el pie de figura.



**Figura 8.-** Corrimiento del gel de agarosa para los productos de la PCR de camarones peneidos infectados experimentalmente. Carril 1, Marcador de peso molecular; carril 2, control positivo; carril 3, control negativo; carril 4 y 6, muestras de camarones positivos para WSSV, entre estos dos carriles, se puede observar la diferencia de concentraciones de material genético viral; carril 5, muestras de camarones negativos para WSSV (Grupo control).

### Hibridación *in situ*

El desarrollo de la infección a nivel celular en los tejidos fue observado gracias a los precipitados azules que se presentaron en el epitelio subcuticular del estómago y tejido branquial, mostrando distintos niveles de tinción y alteración de la morfología celular, lo cual nos indica los diferentes grados de infección entre los tejidos.

Se encontró tejido intacto en el cual no se presentó coloración, por lo que se considera negativo de ser portador del material genético viral, y tejido teñido de azul en una alta proporción, lo cual indica que se trata de células altamente infectadas y cuya alteración a nivel nuclear y citoplasmática puede observarse con mayor claridad con las otras técnicas empleadas.

En los organismos utilizados como grupo control no se encontraron manchas blancas sobre el exoesqueleto ni tampoco las precipitaciones color azul en las laminillas. En los organismos del grupo experimental estuvieron presentes los precipitados azules tenues en el núcleo del epitelio subcuticular y tejido conjuntivo del estómago de los organismos .

Estos tejidos poseen una morfología con cambios a nivel celular y tisular en infecciones agudas; en este nivel de infección se observan núcleos anormales, con un diámetro mayor al promedio y en el caso de las células que han experimentado la lisis, se observa solo el material genético viral diseminado de manera intercelular.

En la figura 7C, se observa tejido subcuticular del estómago de *L. vannamei* infectado con WSSV en diferentes fases de desarrollo. En la figura 7D, tejido branquial que reaccionó con la hibridación *in situ*, en donde los cuerpos de inclusión desarrollados y el material genético de WSSV diseminado de manera intercelular en los filamentos primarios y secundarios de la estructura (←).

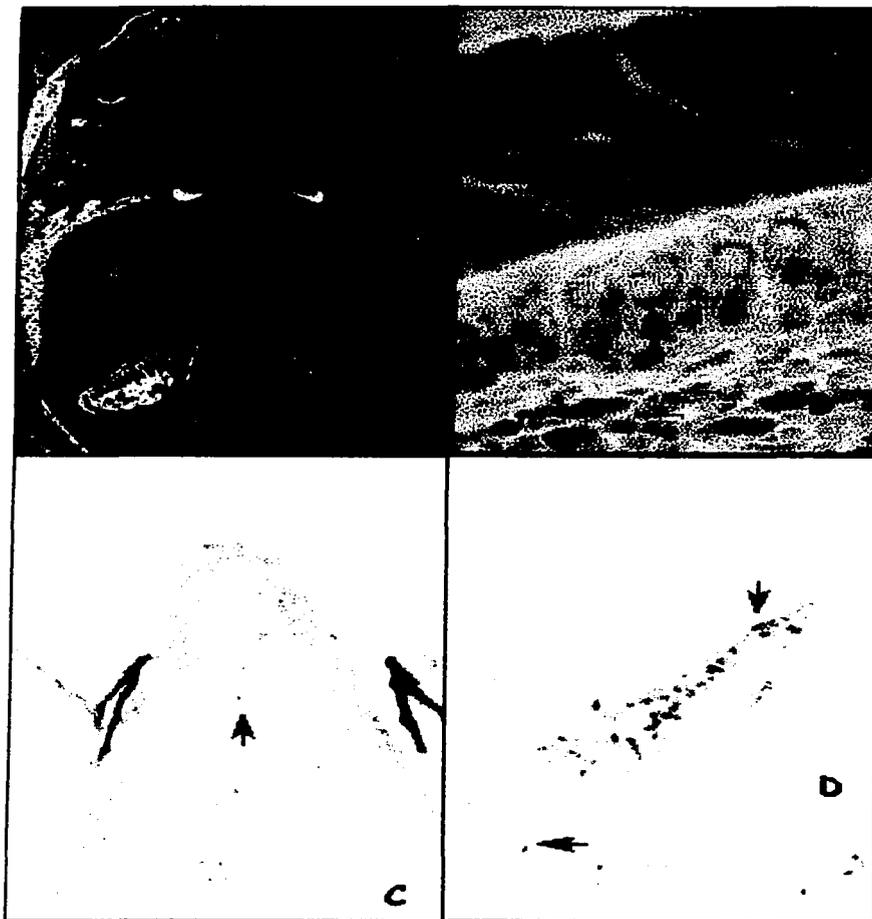
En el caso del tejido branquial se observan precipitados azules intensos a nivel nuclear y en el área de las células que han perdido su estructura se puede ver la

diseminación del material viral a manera de manchas azules, pero sin una apariencia puntual, lo cual da como resultado que en estas áreas el tejido muestre desintegrado.

En el hepatopáncreas se pudieron observar precipitaciones aisladas o manchas no bien definidas en los espacios intertubulares, particularmente en el tejido conjuntivo y células mioepiteliales, lo que indica que el grado de infección de este órgano es menor a los antes mencionados. Por otro lado, las células que forman parte del interior o a los túbulos no presentaron precipitados, indicando la ausencia de material viral, manteniéndose así la estructura celular y tisular.

En la región dorsal del cefalotórax, principalmente en la zona central que corresponde a la espina rostral, se presentaron precipitaciones azules en el tejido conjuntivo. En los primeros segmentos de los pereiópodos se observaron precipitaciones azules tenues, pero no cuerpos de inclusión .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 7.-** A-D, Fotomicrografías de cortes histológicos de un organismo juvenil de *L. vannamei* infectado con WSSV. A, B, Hematoxilina-Eosina /Floxina. Microscopía de fluorescencia. A, Panorámica de un corte transversal del estómago; B, Detalle del epitelio subcuticular del estómago en donde se observan cuerpos de inclusión en diferentes fases de desarrollo (←).C, D, Hibridación *in situ*. Microscopía de campo claro. La reacción de la hibridación *in situ* positiva para WSSV es indicada por las precipitaciones azul oscuro en los núcleos de las células. C, Branquias con células epiteliales positivas. D, Epitelio columnar subcuticular del estómago. ESC, Epitelio subcuticular; TC, tejido conjuntivo.

#### 4.0 Discusión

Con base en los resultados presentados en este trabajo, los signos clínicos que se detectaron en la totalidad de los camarones sometidos a la infección experimental, fueron una baja en el consumo de alimento debida a la falta de apetito y letargia, mismos síntomas que han sido reportados por Sahul *et al.* (2000). La infección de WSSV, se hizo evidente de manera macroscópica mediante la aparición de las manchas blancas localizadas en la región del cefalotórax de la totalidad de los animales (Takahashi *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Chou *et al.*, 1995). Otra respuesta a la infección fue un enrojecimiento del cuerpo debido a la excitación de los cromatóforos subcuticulares, a nivel de los urópodos, el telson, los pereiópodos y los pleópodos (Momoyama *et al.* 1994). Las observaciones realizadas en los tejidos de los camarones infectados de este trabajo coinciden con las hechas por Wang *et al.* (1997b) y Kasornchandra *et al.* (1998); los cuales reportan que la apariencia de los cuerpos de inclusión intranucleares concuerdan con los que se desarrollan con la presencia del IHNV, sin embargo, las inclusiones tipo Cowdry A en el cuadro clínico con el síndrome de la mancha blanca representan estadios tempranos de la infección viral de esta enfermedad.

Las características diagnósticas de la presencia de WSSV descritas a nivel microscópico por autores como Wongteerasupaya *et al.* (1995); Lightner (1996); Wang *et al.* (1997a, 1997b) y Sahul *et al.* (2000), coincide con las mostradas en las figuras 2 a 7, donde se observan los cuerpos de inclusión en los núcleos hipertrofiados de las células infectadas. Mediante la utilización de histología convencional y microscopía fotónica, empleadas en este trabajo, estos cuerpos de inclusión localizados en distintos tipos tisulares, son similares a los descritos en *P. japonicus*, *P. chinensis*, *P. monodon*, *P. indicus* y *P. merguensis* por Karunasagar y Karunasagar (1997); Kasornchandra *et al.* (1998); Chou *et al.* (1995); Inouye *et al.* (1994); Kasornchandra *et al.* (1995) y Momoyama *et al.* (1994).

Utilizando la técnica de Hematoxilina-Eosina, los resultados obtenidos en este trabajo, concuerdan con lo presentado por Lightner (1996); Chang *et al.* (1996, 1998b); Durand *et al.* (1996, 1997); Wang *et al.* (1997b); Lu *et al.*, 1997); Mohan *et al.* (1998); Kuo *et al.* (1998); Karunasagar y Karunasagar (1998); Sudha *et al.* (1998) y Rajendran *et al.*

(1999), en cuanto a las características de los cuerpos de inclusión, los cuales son eosinófilos en sus etapas iniciales, mientras que en las etapas terminales se tornan basófilos. En este trabajo, además de utilizar esta técnica, los resultados obtenidos involucran las técnicas de Moreno de Bismark, Hematoxilina-Eosina/Floxina, técnica de Mallory y la tinción de Lendrum para identificar los tejidos en donde se desarrolló la formación de cuerpos de inclusión como son: el epitelio subcuticular, las branquias, el órgano linfoide, el epitelio subcuticular del estomago, la glándula antenal, el tejido hematopoyético, el *vas deferens*, el tejido conjuntivo general, el ovario y el cordón nervioso ventral, todos estos de origen ectodérmico y mesodérmico y como lo mencionan autores como: Inouye *et al.* 1994; Momoyama, *et al.*, 1994; Chou, *et al.*, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995 y Kasornchandra *et al.*, 1998. Mediante la utilización de técnicas de tinción convencionales, el material genético viral se observa en estadios en los que existe el desarrollo de cuerpos de inclusión intranucleares. En el caso de células o tejidos que se encuentran en estadios iniciales de infección, ésta no puede ser observada y determinada debido a que no existen alteraciones morfológicas de las estructuras.

Durante el diagnóstico de infecciones positivas del WSSV, el uso de técnicas histopatológicas, así como técnicas de microscopía electrónica de transmisión, están limitadas a factores como: a) análisis de un número pequeño de muestras dentro de un universo muy amplio de organismos que pueden estar o no infectados o bien, ser asintomáticos y b) requerimiento de grandes periodos para la aplicación de las técnicas de manera rutinaria (Durand *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997a; Wang *et al.*, 1998a). El más claro ejemplo en este trabajo es la técnica de Lendrum la cual puede llegar a requerir de hasta 80 horas para proporcionar un diagnóstico. Recientemente el desarrollo de las diferentes técnicas moleculares, ha permitido valorar de manera más rápida a estos organismos. De acuerdo con Lo *et al.*, (1997), el diagnóstico por PCR es mucho más fácil y rápido, pudiéndose confirmar con estudios de hibridación *in situ*, incrementando la velocidad y eficiencia en los diagnósticos. En este trabajo, se aplicaron ambas técnicas obteniendo resultados en un periodo corto, en el caso de la PCR y confirmando la presencia y ubicación del material genético viral en los diferentes tipos tisulares del huésped.

En los últimos años, la técnica de la PCR, se ha convertido en una de las herramientas más poderosas en el diagnóstico de enfermedades virales en camarones peneidos. Lightner (1996), Durand *et al.* (1996) y Nadala *et al.* (1998), mencionan que ésta, es una técnica que tiene la ventaja de utilizar solo la hemolinfa o segmentos de músculo, como en este trabajo, de los camarones infectados para su diagnóstico evitando el sacrificio del organismo. Esto último es de importancia particular cuando el monitoreo requiere del registro de determinadas características de la población. Varios tipos de microorganismos patógenos, y particularmente virus, pueden ser detectados de forma directa en muestras muy pequeñas con la utilización de métodos de PCR. Esta técnica, tiene la ventaja sobre otros métodos que usan ácidos nucleicos, de que la sensibilidad de detección en muchas de estas pruebas es de  $10^4$ - $10^5$  moléculas de un patrón homólogo, mientras que la PCR tiene una sensibilidad de 10 moléculas en un patrón similar (Karunasagar y Karunasagar, 1998). Para este trabajo, esta prueba resultó ser eficiente por la sensibilidad que tiene al emplear cantidades muy pequeñas de material genético viral así como el tiempo empleado. Se puede realizar un diagnóstico positivo, sin sacrificar al organismo muestreado; sin embargo, no provee información del avance que tiene la infección, solo nos da un resultado positivo o negativo, pero no la información cuantitativa ni la ubicación de la infección dentro del organismo.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la enfermedad, posterior a la infección experimental en los acuarios, corroboran lo propuesto por Lo, *et al.* (1998), en cuanto a emplear a la PCR para predecir mortalidad dentro de las poblaciones infectadas con WSSV. Experimentalmente, el tiempo de esta mortalidad puede ser estimado, sin embargo en el medio natural o un estanque de cultivo en donde las condiciones bióticas y abióticas están sin control o controladas en parte, la variable tiempo, difícilmente puede ser estimado.

Con respecto al empleo de la técnica de hibridación *in situ*, y de acuerdo con autores como Chang *et al.* (1996) y Durand *et al.* (1996), es más ventajosa la utilización de esta técnica para detectar el material viral de WSSV que las tinciones aplicadas durante el desarrollo de las técnicas histológicas, microscopía electrónica o la PCR. Así como en la literatura, en este trabajo se ha demostrado que la hibridación *in situ*, proporciona la ventaja principal, el detectar de manera más clara y rápida la diseminación

del material viral de WSSV en las preparaciones, la ausencia de cualquier precipitado en los tejidos del huésped, sugiere que ésta prueba no reacciona con el tejido sano. Los baculovirus ocluidos pueden ser detectados en los tejidos huésped por medio de esta prueba, antes de que existan cuerpos de oclusión. Otra ventaja de esta técnica es obtener con mayor precisión la ubicación del material de DNA viral en los tejidos del organismo huésped, ya que existe gran especificidad de interacción entre la muestra y la secuencia patrón de DNA viral, respuesta que no es posible obtener mediante el análisis por PCR (Durand *et al.*, 1996).

En la tabla 2, se resumen las ventajas y desventajas que proporcionan cada una de las técnicas empleadas durante el desarrollo del trabajo, analizando preferentemente factores como el costo-beneficio, el tiempo de procesamiento para la obtención del diagnóstico, factor de suma importancia para la toma de decisiones con relación a la posible cosecha de emergencia. Se ha reportado que tanto en el ambiente, como en las granjas camaronícolas en donde la densidad de organismos es más alta que en el medio natural, el WSSV puede transmitirse a través de agua contaminada o por ingestión de tejido contaminado que se da durante el fenómeno del canibalismo de los organismos moribundos, como lo mencionan Kasornchandra *et al.*, 1995; Suppamattaya *et al.*, 1996; Durand *et al.*, 1996; Suppamattaya *et al.*, 1998 y Chou *et al.*, 1998. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, y los reportes de Wang *et al.* (1997a, 1998a) y Lo, *et al.* (1997), existe la posibilidad de tener en los cuerpos de agua asociados con los estanques de siembra, organismos asintomáticos y portadores de la enfermedad, estos últimos pudiendo convertirse en vectores de ésta. Casos como éstos se han reportado en la fauna carcinológica asociada a los estanques de cultivo, particularmente en *Callinectes sapidus* o jaiba azul y en los copépodos que conforman en un alto porcentaje el zooplancton, por ejemplo, Kanchanaphum *et al.* (1998), al analizar material genético de ambos tipos de organismos mediante la técnica de PCR, obtiene que ambos tipos de organismos resultaron positivos para WSSV, sin embargo al hacer el análisis por medio de hibridación *in situ*, solo *C. sapidus* resultó positivo de ser portador del material viral a nivel tisular.



## 5.0 Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos permiten concluir que:

- ✓ La aparición de las manchas blancas sobre el exoesqueleto del organismo, asociado con un enrojecimiento del cuerpo, de los apéndices locomotores y de las antenas, fueron las características macroscópicas externas que indican una infección producida por WSSV.
- ✓ Mediante técnica histológica convencional y el uso de microscopía fotónica, WSSV se hace evidente por la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares, localizados en diferentes estadios de desarrollo de los tipos tisulares de origen ectodérmico y mesodérmico del huésped.
- ✓ En el caso de WSSV, las técnicas histológicas convencionales, son una herramienta de gran utilidad para la detección de la enfermedad a partir de la formación de cuerpos de inclusión en los tejidos blanco, sin llegar a ser específicas en cuanto a la diagnosis del patógeno. Para diagnosticar con un porcentaje alto de confianza, debe conocerse a fondo el comportamiento de los cuerpos de inclusión para no confundirlo con otros tipos virales como sería el IHNV.
- ✓ El uso de técnicas moleculares como la PCR y la Hibridación *in situ*, tienen la ventaja de ser precisas por la cantidad de material necesario de reacción y la especificidad en la localización del DNA viral. La problemática para la utilización de estas técnicas son: el empleo de personal capacitado así como una infraestructura determinada y costos más elevados que en el empleo de técnicas histológicas convencionales.
- ✓ Para emitir un diagnóstico completo y lo más preciso posible sobre la infección producida por el WSSV, es necesario el aplicar diferentes herramientas como lo son las técnicas histológicas convencionales y las



técnicas moleculares, ya que cada una de ellas aporta información que complementa un diagnóstico global.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

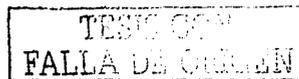
## 6.0 Recomendaciones

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, creemos que existen dos factores, los cuales tienen que ser considerados como importantes, primero el tiempo de la aplicación de las técnicas y el segundo el costo de las mismas. En estas dos directrices es en donde se tiene que realizar más investigación para el desarrollo de técnicas que permitan abatir ambos aspectos. En el caso de las técnicas histológicas convencionales, en donde el factor más importante a vencer es el tiempo de procesamiento de las muestras se hacen las siguientes recomendaciones:

- Aplicar técnicas de tinción rápidas que puedan llevarse a cabo *in situ*, evitando el traslado del material biológico al laboratorio de diagnóstico y por lo tanto la pérdida de tiempo durante el transporte.
- Es necesario el desarrollo de técnicas específicas para material genético, las cuales ofrezcan la posibilidad de identificar, con un grado de veracidad significativo ácidos nucleidos aún en los estadios de desarrollo tempranos de los cuerpos de inclusión.

Para el caso de las técnicas moleculares, el aspecto de mayor importancia que tiene que ser considerado es el factor económico. Aunque los costos se abaten cuando se procesa una cantidad de muestras considerable, la aplicación de este tipo de técnicas es aún alto, esto aunado a la especificidad del equipo que tiene que ser empleado para el desarrollo adecuado de dichas técnicas. Es por esto que existe la necesidad de:

- Desarrollar kits que puedan ser aplicados en las granjas con un costo accesible al público en general.
- Facilidad de uso en los kits no dependiendo de la infraestructura de un laboratorio de biología molecular.



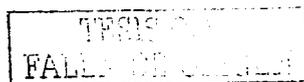
Los factores antes mencionados son importantes dentro del campo del diagnóstico pero a nivel comercial, tiene que tomarse en cuenta también el:

- Realizar muestreos de manera periódica en los estanques de producción de la granja, detectando así la presencia de WSSV en etapas iniciales de infección.
- Establecimiento de protocolos de monitoreo para la detección de agentes infecciosos, no solo virales sino la mayor gama de posibles simbiosis de los camarones, así como la certificación de semilla sana libre del virus.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 7.0 Bibliografia

- ABD/NACA, 1991. Fish health Management in Asia-Pacific. Report on a regional study and workshop on fish diseases and fish health management. ABD Agriculture Department Report. Series No. 1. Network of aquaculture Centers in the Asia Pacific, Bangkok, Thailand.
- Alday-Sanz, V. and T. W. Flegel. 1997. The risk of introducing yellow-head and white-spot viral infections from Asia to the Americas, CD ROM Paper No 1, IV Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 22-27 October, 1997, Guayaquil, Ecuador. 9 pp.
- Anderson, J. I. W., Conroy, D. A., 1968. The significance of disease in preliminary attempts to raise crustacea in sea water. Bull. Off. Int. Epiz. 69, 1239–1247.
- Austin, B. and D. A. Austin. 1987. Bacterial fish pathogens. Diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood Series. England. 364 pp.
- Austin, B. and D. A. Austin. 1989. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. Ellis Horwood Limited. England. 317 pp.
- Barkate, J. A., Laramore, C. R., Hirono, Y., Persyn, H., 1974. Some marine microorganisms related to shrimp diseases. In: Proc. 5th Ann. Workshop, Vol. 5. World Mariculture Society, pp. 267–282.
- Baxter, K. N., Rigdon, R. H., Hanna, C., 1970. *Pleistophora* sp. Microsporidia: *Nosematidae* : a new parasite of shrimp. J. Invertebr. Pathol. 16, 289–291.
- Bell, T. A. and D. V. Lightner. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society. Aquaculture Development Program, State of Hawaii. 114 pp.
- Brock, J. A. and Lightner, D. V. 1990a. Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. In: Kinne, O. Ed. , Diseases of Marine Animals, Vol. III. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, pp. 245–349.
- Brock, J. A. and Lightner, D. V. 1990b. Diseases of crustacea. Diseases caused by proliferative lesions and neoplasia. In: Kinne, O. Ed. , Diseases of Marine Animals, Vol. III. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, pp. 390–400.
- Brock, J. A., R. Gose, D. V. Lightner and K. W. Hasson. 1995. An overview on Taura syndrome, An important disease of farmed *Penaeus vannamei*. P. 84-94. In: C. L. Browdy and J. S. Hopkins (Eds.) Swimming trough troubled water. Proceedings of the special session on shrimp farming. Aquaculture '95 World Aquaculture Society, San Diego , California. 253 p.
- Cai, S., Huang J., Wang C., Song X., Sun X., Yu J., Zhang Y. and Yang C. 1995. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993–1994. J. Fish. China 19, 112–117.



Chang, P. S., C. F. Lo, Y. C. Wang and G. H. Kuo. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.* 27:131-139.

Chang, P. S., H. C. Chen and Y. C. Wang. 1998a. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture.* 164: 233-242.

Chang, P. S., H. C. Chen and Y. C. Wang. 1998b. The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome virus. *Aquaculture.* 166:1-17.

Chanratchakool, P. and C. Limsuwan. 1998. Application of PCR and formalin to prevent white spot disease in shrimp. In: Flegel T. W. (Ed) *Advances in shrimp biotechnology.* National Center for genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. p. 287-289.

Chen, S. N. 1995. Current status of shrimp aquaculture in Taiwan. In: Browdy C. L. and J. S. Hopkins (eds.) *Swimming through troubled water. Proceedings of the special session on shrimps farming, Aquaculture '95.* World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 29-34.

Chen, S. N. and C. S. Wang. 1999. Establishment of cell culture systems from penaeid shrimp and their susceptibility to white spot disease and yellow head viruses. *Methods in Cell Science* 21: 199-206

Chou, H., C. Huang, C. Wang, H. Chiang and C. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 23:165-173.

Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. F. Lo and G. H. Kou. 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture.* 164: 263-276.

Conroy, D. A. y G. Conroy., 1990, *Manual de patologia de los camarones peneidos.* 2a. edición, Maracoy Venezuela, 197 pp.

Cook, H. L. 1971. Fungi parasitic on shrimp. *FAO Aquacult. Bull.* 3 4: 13.

Cook, D. W. and S. R. Lofton. 1973. Chitinoclastic bacteria associated with shell disease in *Penaeus* shrimp and the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Wild. Dis.* 9: 154-159.

Couch, J. A. 1974a. Free and occluded virus similar to *Baculovirus* in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature.* 247 (5438): 229-231.

Couch, J. A. 1974b. An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invertebr. Pathol.* 24: 311-331.

Durand, S., D. V. Lightner, L. M. Nunan, R. M. Redman, J. Mari and J. R. Bonami. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 27:59-66.

Durand, S., D. V. Lightner, R. M. Redman, and J. R. Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSBV). *Dis. Aquat. Org.* 29: 205-211.

Egusa, S., T. Ueda. 1972. A *Fusarium* sp. associated with black gill disease of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 38: 1253-1260.

FAO. 1997a. Inland Water Resources and Aquaculture Service, Fishery Resources Division. Review of the state of world aquaculture. FAO Fisheries Circular No. 886, Rev. 1. Rome, FAO, 163 pp.

FAO. 1997b. Anuario Estadístico de Pesca. Vol. 84. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Ferrer, R. D. 1931. Manual de técnica histológica. Librería Sintés. Barcelona, España. 381 pp.

Flegel, T. W. 1997. Special topic review: Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 13: 433-442.

Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson, and F. Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses. *Archives of virology*, Springer-Verlag, Vienna, p. 450.

Gómez, G. B., A. Roque y A. L. Guerra. 2001. Enfermedades infecciosas comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: Páez. O. F. (Ed) Camaronicultura y Medio Ambiente. El Colegio de Sinaloa e Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Pp. 273-295.

Hameed, A. S. S., B.L.M. Murthi, M. Rasheed, S. Sathish, K. Yoganandhan, V. Murugan and Kunthala Jayaraman. 2002. An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus WSSV transmission to *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 204: 1-10.

Hasson, K. W., D. V Lightner, B. T Poulos, R. M. Redman, B. L. White, J. A. Brock and J. R. Bonami. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.* 23: 115-126.

Hernández, M. M. 1995. Importancia de regular los aspectos sanitarios dentro de la actividad camaronícola. Memorias de la reunión técnica sobre cultivo de camarón en el Golfo de México y Mar Caribe. Dirección General de Investigación en Acuicultura. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP). México. 69 pp.

Hosseini, M. S., A. Chakraborty, B. Joseph, S. K. Ota, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture.* 198: 1-11.

Huang, J., X. L. Song, J. Yu and C. H. Yang. 1994. Baculoviral hypodermal and haematopoietic necrosis-pathology of the shrimp explosive epidemic disease. Yellow Sea Fishery Research Institute, Qingdao, P. R., China (Abstract)

Hulten, M. C. W., M. F. Tsai, C. A. Schipper, C. F. Lo, G. H. Kou and J. M. Vlak. 2000a. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J. of General Virology*. 81:307-316.

Hulten, M. C. W., M. Westenberg, S. D. Goodall and J. M. Vlak. 2000b. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*. 266: 227-236.

Hulten, M. C. W., J. Witteveldt, M. Snippe and Just M. 2001a. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*. 285: 228-233.

Hulten, M. C. W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R. K. Lankhorst and J. M. Vlak . 2001b. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*. 286: 7-22.

Inouye, K., S. Miwa, N. Osenko, H. Nakano, T. Kimura, K. Momoyama and M. Hiraoka. 1994. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol.* 29: 149-158.

Inouye, K., K. Yumano, N. Ikeda, T. Kimura, H. Nakano, K. Momoyama, J. Kobayashi and S. Miyajima. 1996. The Penaeid Rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathology*. 31(1): 39-45.

Itami, T., M. Maeda, N. Suzuki, K. Tokushige, A. Nakagawa, O. Hennig, M. Kondo, J. Kasornchandra, I. Hirono, T. Aoki, R. Kusuda and Y. Takahashi. 1998. In: Flegel T. W. (Ed) *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. p. 291-295.

Ishikawa, Y., 1966. A disease of young cultured Kuruma-prawn *Penaeus japonicus*. *Bate. Bull. Fish. Exp. Sta. Okayama Pref., Jpn.*, pp. 5-9 in Japanese .

Ishikawa, Y., 1967. On the filamentous bacteria which grow on the gills of cultured Kuruma-prawn. *Fish Pathol.* 2, 68-72, In Japanese .

Iversen, E. S., Manning, R.B., 1959. A new microsporidian parasite from the pink shrimp *Penaeus duorarum* . *Trans. Am. Fish. Soc.* 88, 130-132.

Jiménez, G. F. 1999. Atlas de enfermedades de peneidos. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Subsecretaría de Pesca. Dirección General de Acuicultura. 80 pp.

Johnson, S. K., Parker, J. C., Holcomb, W. H., 1973. Control of *Zoothamnium* on penaeid shrimp. *Proc. 4<sup>th</sup> Ann. Workshop, Vol. 4. World Mariculture Society*, pp. 321-331.

Johnson, S. K., 1975. Handbook of Shrimp Diseases. Sea Grant Publ. SG-75-603. Texas A&M University, College Station, TX, 19 pp.

Kanchanaphum, P., C. Wongteerasupaya, N. Sitidilokratana, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Wityachumnarnkul and T. W. Flegel. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 34: 1-7.

Karunasagar, I. and I. Karunasagar. 1997. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome virus of *Penaeus monodon* along the west coast of India. Aquaculture. 153: 9-13.

Karunasagar, I. and I. Karunasagar. 1998. Molecular probes and polymerase chain reaction (PCR)-based kits for diagnosis of shrimp diseases. NAGA. January-March. 26-30.

Kasornchandra, J., S. Boonyaratpalin, R. Khonpradit and U. Ekpanithanpong. 1995. Mass mortality caused by systemic bacilliform virus in cultured shrimp, *Penaeus monodon*, in Thailand. Asian Shrimp News. 5: 2-3.

Kasornchandra, J. and S. Boonyaratplain. 1998. Primary shrimp cell culture: Applications for studying White spot syndrome virus (WSSV). In: Flegel T. W. (Ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for genetic Engineering and biotechnology. Bangkok. p. 273-276.

Kasornchandra, J., S. Boonyaratpalin and T. Itami. 1998. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. Aquaculture. 164: 243-251.

Kim, C. K., P. K. Kim, S. G. Sohn, D. S. Sim, M. A. Park M. S. Heo, T. H. Lee, J. D. Lee, H. K. Jun and K. L. Jang. 1998. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with white syndrome (WSBV) in penaeid shrimp. J. of Fish Diseases. 21: 11-17.

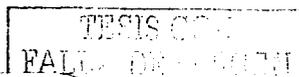
Krishna, R. R., K. G. Rao, P. Rao and P. H. Babu. 1997. White spot disease. World Aquaculture. 28(4): 14-19.

Kuo, G. H., Peng S. E., Chiu Y. L. and Lo C. F. 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In: Flegel T. W. (Ed). Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. pp. 267-271.

Kusada, R. and A. Watada. 1969. A new pathogenic bacterium, belonging to the genus *Vibrio*, isolated from diseased spiny lobster and prawn. Res. Rep. Kochi Univ. 18: 77-79.

Lewis, D. H. 1973. Response of brown shrimp to infection with *Vibrio* sp. Proc. 4th Ann. Workshop, Vol. 4. World Mariculture Society. pp. 333-338.

Lightner, D. V. and Fontaine C. T. 1973. A new fungus disease of the white shrimp *Penaeus setiferus*. J. Invertebr. Pathol. 22, 94-99.



Lightner, D. V., 1975. Some potentially serious diseases problems in the culture of penaeid shrimp in North America. Proc. U.S.–Japan Natural Resources Program, Symposium on Aquaculture Diseases, Tokyo, pp. 75–97.

Lightner, D. V. 1996. A Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Special publication of the World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Lightner, D. V. and D. H. Lewis. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. In: Diseases of Crustaceans. Mar. Fish. Rev. 37: 25–28.

Lightner, D. V., R. M. Redman, T. A. Bell and J. A. Brock. 1983. Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. J. World Maric. Soc. 14: 212-225.

Lightner, D. V., R. M. Redman, B. T. Poulos, L. M. Nunan, J. I. Mari and K. W. Hasson. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Rev. Sci. Tech. Aff. Int. Epiz. 16(1): 146-160.

Lightner, D. V. and R. M. Redman. 1992. Penaeid virus diseases of the shrimp culture industry of the Americas. 569- 588. In: Fast A. W. and L. J. Lester (Eds) Marine shrimp culture: Principles and practices. Elseiver . USA.

Lightner, D. V. and R. M. Redman. 1998. Shrimp Diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164: 201-220.

Liu, W. J., H. T. Yu, S. E. Peng, Y. S. Chang, H. W. Pien, C. J. Lin, C. J. Huang, M. F. Tsai, C. J. Huang, C. H. Wang, J. Y. Lin, C. F. Lo and G. H. Kou. 2001. Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a protein kinase. Virology. 289: 362-377.

Lo, C. F., C. H. Ho, C. H. Chen, K. F. Liu, Y. L. Chiu, P. Y. Yeh, S. E. Peng, H. C. Hsu, H. C. Liu, C. F. Chang, M. S. Su, C. H. Wang and G. H. Kou. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) I captured brooders of *Penaeus monodon* with special emphasis on reproductive organs. Dis. Aquat. Org. 30: 53-72.

Lo, C. F., Y. S. Chang, C. T. Cheng and G. H. Kou. 1998. PCR monitoring of cultured shrimp for white spot syndrome virus (WSSV) infection in growout ponds. In: Flegel T. W. (Ed). Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. pp. 281-286.

Lo, C. F., H. C. Hsu, M. F. Tsai, C. H. Ho, S. E. Peng, G. H. Kou. And D. V. Lightner. 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. Dis. Aquat. Org. 35: 175-185.

Lu, Y., L. M. Tapay, P. C. Loh, G. R. Gose and J. A. Brock. 1997. The pathogenicity of a baculo-like virus isolated from diseased penaeid shrimp obtained from China for cultured penaeid species in Hawaii. Aquaculture International. 5: 277-282.

- Luna, L. E. (Ed). 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. Mc Graw Hill. USA. 258 pp.
- Mohan, C. V., K. M. Shankar, S. Kulkarni and P. M. Sudha. 1998. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. Dis. Aquat. Org. 34: 9-12.
- Momoyama, K., M. Hiraoka, H. Nakano, H. Koube, K. Inouye and N. Oseka. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: histopathological study. Fish Pathol. 29: 141-148.
- Nadala, E. C. and P. C. Loh. 1998. A comparative study of three different isolates of white spot virus. Dis. Aquat. Org. 33: 231-234.
- Nadala, E. C., L. M. Tapay and P. C. Loh. 1998. Characterization of a non-occluded baculovirus-like agent pathogenic to penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 33: 221-229.
- Nadala, E. C. and P. C. Loh. 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow head virus of penaeid shrimp. J. of Virological Methods. 84: 175-179.
- Nakamura, K., S. Wada, K. Hatai and T. Sugimoto. 1994. *Lagenidium myophylum* infection in the constrict shrimp, *Pandalus hypsinotus*. Mycoscience. 35: 99-104.
- Nakano, H., H. Koube, S. Umezawa, K. Momoyama, M. Hiraoka, K. Inouye and S. Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in 1993: epizootiological survey and infection trials. Fish Pathol. 29: 135-139.
- Nunan, L. M. and D. V. Lightner. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). J. of Virological Methods. 63: 193-201.
- Nunan, L. M., B. T. Poulos and D. V. Lightner. 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. Aquaculture. 160: 19-30.
- Overstreet, R. M., 1973. Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared hosts. Aquaculture 2, 105-140.
- Overstreet, R. M., D. V Lightner, K. W. Hasson, S. Mc-Illwain and J. M. Lotz. 1997. Susceptibility to Taura syndrome virus of some penaeid shrimp species native to the Gulf of Mexico and the southeastern United States. J. invertebrate Pathol. 69: 165-176.
- Peng, S. E., C. F. Lo, C. H. Ho, C. F. Chang, and G. H. Kou. 1998. Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. Aquaculture 164: 253-262.

- Provenzano, J. A. 1985. Comercial culture of decapod crustaceans 269-314 pp. In: Provenzano J. A: (Ed). Economic aspects: Fisheries and culture. Vol. 10. In: Bliss D. E. (Ed). The biology of crustacea.
- Rajendran, K. V., K. K. Vijayan, T C. Santiago and R. M. Krol. 1999. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns crabs and lobsters from India. J. of Fish Diseases. 22: 183-191.
- Rosenberry, B. 1995. India and Thailand world shrimp farming 1995. Shrimp News International, San Diego, CA.
- Sahul, A. S., M. Anilkumar, M. L. Stephen and K. Jarayaman. 1998. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. Aquaculture. 160: 31-45.
- Sahul, A. S., M. X. Charles, and M. Anilkumar. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. Aquaculture. 183: 207-213.
- Sahul, A. S., K. Yoganandhan, S. Sathish, M. Rasheed, V. Murugan and K. Jayaraman. 2001. White spot syndrome virus WSSV in two species of freshwater crabs *Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*. Aquaculture 201: 179-186.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. II. pp. 142.
- Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP). 1999. Anuario Estadístico de Pesca. Dirección General de Política y Fomento Pesquero. México. 271 pp.
- Sheehan, D. C. and B. B. Hrapchak. 1980. Theory and practice of histotechnology. The C. V. Mosby Company. USA. 481 pp.
- Sindermann, C. J. 1990. Principal Diseases of marine fish and shellfish. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press. USA. 521 pp.
- Sindermann, C. J. and D. V. Lightner. 1988. Disease diagnosis and control in North American Marine Aquaculture. Elsevier Scientific Publish. Co. Amsterdam, Oxford. 329 pp.
- Sparks, A. K. and Lightner, D. V. 1973. A tumorlike papilliform growth in the brown shrimp *Penaeus aztecus* .J. Invertebr. Pathol. 22, 203-212.
- Sprague, V., 1950. Notes on three microsporidian parasites of decapod Crustacea of Louisiana coastal waters. Occ. Pap. Mar. Lab. LA State Univ. No. 5, 7 pp.
- Sudha, P. M., C. V. Mohan, K. M. Shankar and A. Hegde. 1998. Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. Aquaculture. 167: 95-101.
- Supamattaya, K. and S. Boonyaratpalin. 1996. The study of histopathology and cytopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) caused by yellow-head

virus and red color and white spot disease virus. *Songklanakarinn. J. Sci. Technol.* 18(1): 17-33.

Supamattaya, K., R. W. Hoffmann, S. Boonyaratpalin and P. Kanchanaphum. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Dis. Aquat. Org.* 32: 79-85.

Takahashi, Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fuji, S. Tomonaga K. Supamattaya and S. Boonyaratpalin. 1994. Electron microscopy evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol.* 29:121-125.

Tang, K. F. J. and D. V. Lightner. 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture.* 189: 11-21.

Tapay, L. M., E. C. B. Nadala and P. C. Loh. 1999. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. *J. Virological Methods.* 82: 39-43.

Tsai, M. F., H. T. Yu, H. F. Tzeng, J. H. Leu, C. M. Chou, C. J. Huang, C. H. Wang, J. Y. Lin, G. H. Kou and C. F. Lo. 2000a. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thimidylylate kinase. *Virology.* 277: 100-110.

Tsai, M. F., C. F. Lo, M. C. W. Hulten, H. F. Tzeng, C. M. Chou, C. J. Huang, C. H. Wang, J. Y. Lin, J. M. Vlak and G. H. Kou. 2000b. Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology.* 277: 92-99.

Villarreal, L. P., V. P. D. Acute and K. A. Gottlieb. 2000. Persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases. *Virology.* 272: 1-6.

Wang, C. H., C. F. Lo, J. H. Leu, C. M. Chou, P. Y. Yeh, H. Y. Chou, M. C. Tung, C. F. Chang, M. S. Su and G. H. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 23: 239-242

Wang, C. H., T. J. Tsai, G. H. Kou and S. N. Chen. 1997a. Detection of white spot disease virus in wild-caught greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis* (de Haan) in Taiwan. *Fish Pathology.* 32(1): 35-41.

Wang, C. S., K. F. J. Tang, G. H. Kou and S. N. Chen. 1997b. Light and electron microscopic evidence of white spot disease in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), and the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), cultured in Taiwan. *J. Fish Diseases.* 20: 323-331.

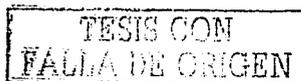
Wang, C. S., Y. J. Tsai and S. N. Chen. 1998a. Detection of white spot Disease virus (WSDV) infection in shrimp using *in situ* hybridization. *J. Invertebrate Pathology.* 72: 170-173.

Wang, Q., B. L. White, R. M. Redman and D. V. Lightner. 1998b. *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 170: 179-194.

Wang, Y. C., C. F. Lo, P. S. Chang, G. H. Kou. 1998c. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture*. 164: 221-231.

Winarno, B. 1995. Shrimp aquaculture in Indonesia. In: Browdy C. L. and J. S. Hopkins (Eds). *Swimming trough troubled water. Proceedings of the special session on shrimps farming. Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 24-28.*

Wongteerasupaya, C. J., E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T. W Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 21:69-77.



## 8.0 Anexos

### Inoculo viral (Anexo I)

Solución concentrada de buffer TN 10X (Tris de NaCl) pH 7.4

Tris Base, 4.22 g/l; NaCl 233.76 g/l; filtrar en una malla de 0.22 µm

Modo de preparación.-

- 1) Homogenizar el tejido con buffer TN 1X Proporción de 1: 4 (p/v).
- 2) Centrifugar a 3,500 g por 5 min.
- 3) Centrifugar sobrenadante a 10,000 g por 10 min.
- 4) Resuspender el pelet.
- 5) Centrifugar a 10,000 g por 5 min.
- 6) Juntar el sobrenadante del paso 4 y el paso 6.
- 7) Dividir el total de la muestra en alícuotas.

### Moreno de Bismark (Anexo II)

Calentar los portaobjetos con los cortes en estufa a 56-58° C	15 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Alcohol Absoluto	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Hidratar las preparaciones en agua destilada	5 min.
Teñir con Moreno de Bismark	15 min.
Lavar con agua de la llave	10 min.
Enjuagar en agua	
Alcohol 70°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol absoluto	5 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Montaje con resina sintética	

Resultados de tinción.-

La totalidad de los componentes tisulares de café claro, pardo o café oscuro.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Hematoxilina-Eosina (Anexo III)

Calentar los portaobjetos con los cortes en estufa a 56-58° C	15 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Alcohol Absoluto	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Agua destilada	5 min.
Hematoxilina de Harris	5 min.
Carbonato de litio	Lavar
Alcohol 30°	5 min.
Alcohol 50°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Eosina alcohólica	3 min.
Alcohol 70°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol absoluto	5 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Montaje con resina sintética	

#### Modo de preparación.-

##### Hematoxilina de Harris.

Hematoxilina 1 gr.; Alcohol 96° 10 ml.; Alumbre de Potasio 20 gr.; Agua destilada 200 ml.; Oxido de mercurio 0.5 gr.; Ácido acético glacial. 8 ml.

Disolver la hematoxilina en alcohol. Disolver el alumbre en el agua usando calor. Mezclar las dos soluciones anteriores; calentar a punto de ebullición; agregar el óxido de mercurio. Enfriar rápidamente por inmersión en agua fría. Agregar el ácido acético glacial cuando la solución este fría. La solución esta apta para ser usada durante tres o cuatro meses guardada adecuadamente en una botella cerrada herméticamente.

##### Eosina.

Eosina (Amarillenta, soluble en agua y alcohol) 1 gr.; Alcohol 70° 100ml.; Timol (o 0.2% v/v formol) 1 cristal pequeño

#### Resultados de tinción.-

Núcleos: azul; Citoplasma: tonalidades de naranjas a rosas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### Hematoxilina-Eosina/Floxina (Anexo IV)

Calentar los portaobjetos con los cortes en estufa a 56-58° C	15 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Alcohol absoluto	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Agua destilada	5 min.
Hematoxilina de Harris	5 min.
Carbonato de litio	Lavar
Alcohol 30°	5 min.
Alcohol 50°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Eosina alcoholica/Floxina	3 min.
Alcohol 70°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol absoluto	5 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Montaje con resina sintética	

Modo de preparación.-

Hematoxilina de Harris. (Ver anexo II)

Eosina/Floxina

Floxina

Eosina (Amarillenta, soluble en agua y alcohol) 1 gr.; Alcohol 70° 100ml.; Timol (o 0.2% v/v formol) 1 cristal pequeño

Resultados de tinción.-

Núcleos: azul; Citoplasma: tonalidades de naranjas a rosas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Técnica de Mallory (Anexo V)

Calentar los portaobjetos con los cortes en estufa a 56-58° C	15 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Alcohol absoluto	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Agua destilada	5 min.
Tiosulfato de Sodio 2.5%	7 min.
Agua corriente	15 min.
Fucsina ácida 0.1%	5 min.
Agua destilada	Lavar
Acido Fosfomolibdico 10%	5 min.
Solución compuesta	5 min.
Agua destilada	Lavar
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol absoluto	5 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Montaje con resina sintética	

Modo de preparación.-

Solución compuesta

Azul de anilina 0.5 gr.; Orange G 2.0 gr.; Ácido oxálico 2.0 gr.; Agua destilada 100 ml.

Resultados de tinción.-

Músculo: Azul; Colágena: rojo; Fibras: tonalidades de azul; Núcleos: azules

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Tinción de Lendrum (Anexo VI)

Calentar los portaobjetos con los cortes en estufa a 56-58° C	15 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Alcohol Absoluto	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Hidratar las preparaciones en agua destilada	5 min.
Teñir con Hematoxilina de Harris	5 min.
Lavar con agua de la llave	10 min.
Solución de floxina	30 min.
Enjuagar en agua y secar	
Solución de Tartrazina	De minutos a horas
Lavar en agua de la llave	
Alcohol 70°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol absoluto	5 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Montaje con resina sintética	

Modo de preparación.-

Hematoxilina de Harris (Ver Anexo II)

Solución de floxina roja

Floxina roja o floxina azul, 0.5 gr.; Calcio clorado, 0.5 gr.; Agregar agua destilada 100 ml.

Guardar esta solución

Solución de Tartrazina

Tartrazina 2.5 gr.; Etilen-glycol monoetil eter, 100 ml.

Resultados de tinción.-

Cuerpos de inclusión se tiñen de rojo brillante; núcleos se tiñen de azul; fondo se tiñe de amarillo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Protocolo PCR para WSSV (IQ2000) (Anexo VII)

- 1.- Etiquetar tubos eppendorf estériles correspondientes a cada una de las muestras a realizar.
- 2.- Hacer los cálculos de cada uno de los reactivos multiplicado por el número de muestras a procesar.
- 3.- En un tubo nuevo, mezclar los siguientes reactivos

Cócteles de las reacciones:

	1ª reacción	2ª reacción
<b>Reactivos</b>		
<b>Master Mix</b>	7.5 µl X n= _____ µl	14 µl X n= _____ µl
<b>Taq Polimerasa</b>	0.5 µl X n= _____ µl	1.0 µl X n= _____ µl
<b>Vol. Total</b>	8.0 µl X n = _____ µl	15 µl X n = _____ µl
<b>Volumen de reacción</b>		
<b>Master Mix</b>	8.0 µl	15.0 µl
<b>Muestra</b>	2.0 µl	2.0 µl
<b>Vol. Total</b>	10.0 µl	17.0 µl

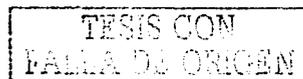
n = Número de muestras a procesar.

4.- Agitar levemente y en cada uno de los tubos previamente etiquetados adicionar para la primera reacción 8.0 µl de la mezcla más 1.0 µl del producto de la extracción de ADN, poner los tubos en el termociclador previamente programado.

5.- Después de terminada la primera reacción mezclar los reactivos para la segunda reacción y agregar a cada uno de los tubos previamente etiquetados 15.0 µl de la mezcla más 1.0 µl del producto de la primera reacción de PCR, poner los tubos en el termociclador previamente programado.

<b>Programas</b>			
<b>1ª reacción</b>		<b>2ª reacción</b>	
<b>Programa No. 1</b>	<b># de ciclos 5</b>	<b>Programa No.4</b>	<b># de ciclos 25</b>
Desnaturalización	94° C 30 seg.	Desnaturalización	94° C 30 seg.
Alineación	62° C 30 seg.	Alineación	62° C 30 seg.
Extensión	72° C 30 seg.	Extensión	72° C 30 seg.
<b>Programa No. 2</b>	<b># de ciclos 11</b>	<b>Programa No.3</b>	<b># de ciclos 1</b>
Desnaturalización	94° C 30 seg.	Extensión final	72° C 30 seg. y 4° C α
Alineación	62° C 30 seg.		
Extensión	72° C 30 seg.		
<b>Programa No. 3</b>	<b># de ciclos 1</b>		
	72° C 30 seg. y 4° C α		

Banda esperada: 296 pb que corresponde a White Spot Syndrome Virus.



### **Extracción de ADN (Anexo VIII)**

A partir de que el ADN se le consideró el transmisor hereditario y de que Watson y Crick presentaron su modelo estructural, este se ha convertido en el componente celular más estudiado, además, por su confirmación y fácil manejo el ADN ha sido parte fundamental para el desarrollo de métodos en la biología molecular.

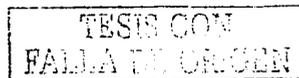
La extracción y purificación de los ácidos nucleicos es el inicio en el análisis por cualquier técnica de Biología Molecular y existen varios métodos por los cuales se puede llevar a cabo, algunos se describen a continuación.

#### **Protocolo de extracción de ADN con el buffer de lisis del kit IQ2000**

- 1.- Marcar los tubos eppendorf de 1.5 ml con la etiqueta correspondiente a cada muestra.
- 2.- Agregar en un tubo de ensayo aproximadamente 20 mg de la muestra (pleópodos, branquias, hemolinfa, o en caso de poslarvas todo el organismo (50), agua de los estanques, zooplancton, etc).
- 3.- Adicionar 500  $\mu$ l de buffer de lisis.
- 4.- Macerar las muestras (con pistilo de plástico)
- 5.- Incubar por 10 min a 95° C.
- 6.- Homogenizar y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 5 min. o incubar de 5 a 10 min. en hielo (la segunda opción es lo más recomendable para precipitar proteínas.
- 7.- Centrifugar por 10 min. a 12,000 g.
- 8.- Etiquetar nuevamente tubos eppendorf de 1.5 ml correspondientes a cada muestra.
- 9.- Agregar 400  $\mu$ l de etanol 95° a 4° C.
- 10.- Transferir los 200  $\mu$ l del sobrenadante a los tubos con etanol.
- 11.- Agitar brevemente y centrifugar a 12,000 g por 5 min.
- 12.- Decantar el etanol y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
- 13.- Resuspender el ADN en H<sub>2</sub>O o en buffer TE 1X (Dependiendo del tamaño y limpieza del pellet obtenido, resuspender en 10, 20, 100, 200, 400  $\mu$ l).

#### **Protocolo de extracción de ADN con el kit DTAB/CTAB**

- 1.- Etiquetar los tubos eppendorf de 2.0 ml con los datos correspondientes a cada muestra.
- 2.- Depositar en los tubos aproximadamente 20 mg. de muestra (pleópodos, branquias, hemolinfa, o en caso de poslarvas todo el organismo (50 larvas o 25 postlarvas), agua de los estanques, zooplancton, artemias o sedimento en estanques, 500 mg.).
- 3.- Adicionar 0.6 ml de DTAB.
- 4.- Macerar el tejido e incubar a 75° C por 5 min.
- 5.- Esperar a que los tubos tomen la temperatura ambiente.
- 6.- Agitar y centrifugar levemente la muestra.
- 7.- Adicionar 0.7 ml. de cloroformo.
- 8.- Agitar por 20 seg.
- 9.- Centrifugar a 12,000 g por 2 min.
- 10.- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo de 2.0 ml.
- 11.- Adicionar 100  $\mu$ l de la solución de CTAB y 900  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O dd.
- 12.- Agitar nuevamente e incubar a 75° C por 5 min.



- 13.- Dejar enfriar hasta que tome la temperatura del ambiente y centrifugar a 12,000 g por 10 min.
- 14.- Decantar el sobrenadante, resuspender el pellet con 150  $\mu$ l de la solución de dilución.
- 15.- Incubar a 75° C por 5 min y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 16.- Centrifugar a 12,000 g por 5 min.
- 17.- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio que contenga 300  $\mu$ l de etanol 95° a 4° C. Agitar levemente y centrifugar a 12,000 g por 5 min.
- 18.- Lavar el pellet con 200  $\mu$ l de etanol 70°, centrifugar levemente y secar el pellet
- 19.- Resuspender el ADN con buffer TE 1X.

#### **Protocolo de extracción de ADN con el kit DNAzol.**

- 1.- Marcar los tubos eppendorf de 1.5 ml. con la etiqueta correspondiente a cada muestra.
- 2.- Agregar en un tubo de ensaye aproximadamente 0.1 g de la muestra (pleópodos, branquias, hemolinfa, o en caso de poslarvas todo el organismo (50), agua de los estanques, zooplankton, etc).
- 3.- Centrifugar de 10,000 a 12,000 g por un min. para sedimentar el tejido y desechar el sobrenadante (Solo para eliminar agua).
- 4.- Adicionar 1 ml de buffer de DNAzol.
- 5.- Macerar las muestras hasta que la solución se torne turbia (Con pistilo de plástico).
- 6.- Incubar por 10 min. a 50° C.
- 7.- Homogenizar y enfriar a 4° C durante 5 min.
- 8.- Centrifugar por 10 min. a 12,000 g.
- 9.- Etiquetar nuevamente tubos eppendorf de 1.5 ml correspondiente a cada muestra.
- 10.- Transferir el sobrenadante y agregar 400  $\mu$ l

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 13.- Dejar enfriar hasta que tome la temperatura del ambiente y centrifugar a 12,000 g por 10 min.
- 14.- Decantar el sobrenadante, resuspender el pellet con 150  $\mu$ l de la solución de dilución.
- 15.- Incubar a 75° C por 5 min y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 16.- Centrifugar a 12,000 g por 5 min.
- 17.- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio que contenga 300  $\mu$ l de etanol 95° a 4° C. Agitar levemente y centrifugar a 12,000 g por 5 min.
- 18.- Lavar el pellet con 200  $\mu$ l de etanol 70°, centrifugar levemente y secar el pellet
- 19.- Resuspender el ADN con buffer TE 1X.

#### **Protocolo de extracción de ADN con el kit DNAzol.**

- 1.- Marcar los tubos eppendorf de 1.5 ml. con la etiqueta correspondiente a cada muestra.
- 2.- Agregar en un tubo de ensaye aproximadamente 0.1 g de la muestra (pleópodos, branquias, hemolinfa, o en caso de poslarvas todo el organismo (50), agua de los estanques, zooplankton, etc).
- 3.- Centrifugar de 10,000 a 12,000 g por un min. para sedimentar el tejido y desechar el sobrenadante (Solo para eliminar agua).
- 4.- Adicionar 1 ml de buffer de DNAzol.
- 5.- Macerar las muestras hasta que la solución se torne turbia (Con pistilo de plástico).
- 6.- Incubar por 10 min. a 50° C.
- 7.- Homogenizar y enfriar a 4° C durante 5 min.
- 8.- Centrifugar por 10 min. a 12,000 g.
- 9.- Etiquetar nuevamente tubos eppendorf de 1.5 ml correspondiente a cada muestra.
- 10.- Transferir el sobrenadante y agregar 400  $\mu$ l

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Protocolo de Hibridación *in situ* para la detección de DNA genómico de WSSV en camarones peneidos.  
WSBV ShrimProbe. DiagXotics, Inc. (Anexo IX)**

**Pasos preliminares.**

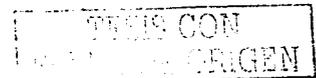
- Incluir en parafina y cortar secciones de 4  $\mu\text{m}$  de grosor o más delgadas.
- Montar los cortes en portaobjetos cargados positivamente.
- Diluir los buffers que se especifican. Los buffers pueden ser diluidos el día anterior a correr la hibridación y guardarlos a 4° C.
- Dejar los buffers a temperatura ambiente antes de usarlos.
- Hacer una solución de Moreno de Bismark al 0.5% en agua destilada. Una vez disuelta, filtrar la solución acuosa a través de papel filtro. Desde la filtración, guardar después en frasco de vidrio color ámbar a temperatura ambiente.
- Hacer una solución de formaldehído/paraformaldehído. Diluir 1.08 ml de formaldehído 37% en 100 ml de buffer PBS 1X, o 4 ml de formalina al 10% en 100 ml de PBS 1X. El paraformaldehído, el cual es usado como fijador, debe estar guardado a 4 °C y ser usado dentro de las dos semanas siguientes.
- Una solución de trabajo de proteinasa K debe de ser preparada disolviendo proteinasa liofilizada con 30 ml de buffer PBS 1X. Esta solución debe ser usada inmediatamente y cualquier remanente no utilizado debe ser guardado en alícuotas de pequeños volúmenes y congelados después de la reconstitución. Deben ser evitadas repetidas congelaciones y descongelaciones.

**Protocolo.-**

1.- Calentar las preparaciones en un horno a temperatura de 65° C por 30 minutos.

2.- Hidratar los tejidos:

Xilol o un sustituto	3 veces por 5 minutos cada uno
Alcohol absoluto	2 veces por 1 minuto cada uno
Alcohol 95 °	2 veces por 1 minuto cada uno
Alcohol 80 °	2 veces por 1 minuto cada uno
Alcohol 50 °	2 veces por 1 minuto cada uno
H <sub>2</sub> O destilada	Sumergir 6 veces



3.- Lavar los portaobjetos por 5 minutos en buffer PBS 1X a temperatura ambiente. Secar las preparaciones.

4.- Con los portaobjetos horizontales, pipetear 0.5 ml de solución de proteinasa K a cada uno de ellos e incubar durante 15 minutos a una temperatura de a 37° C a 65° C. Usar una cámara húmeda para evitar que las preparaciones se resequen. Mientras se incuban las preparaciones, poner en un baño de agua o sobre una placa caliente para poner a hervir la solución de hibridación .

5.- Secar y lavar las preparaciones en buffer PBS 1X con glicina al 0.2% por 5 minutos a temperatura ambiente para inactivar la enzima. Hacer alícuotas de la solución de

hibridación dentro de tubos que puedan alcanzar la temperatura de ebullición. Para determinar el volumen de la solución de hibridación a necesitar, multiplicar el número de portaobjetos por 75  $\mu$ l y agregar 0.2 ml contando las pérdidas potenciales. Para prevenir que se abran los envases durante el proceso de ebullición, se puede hacer un pequeño orificio en la tapa. Para hacer esto, es necesario calentar un alfiler y tocar la tapa del tubo, pero lo necesario solo para hacer escapar la presión que se ejerce desde adentro.

6.- Secar las preparaciones, Sumergir los portaobjetos en 0.4% de formaldehído o paraformaldehído hecho en PBS 1X por 10 minutos a 4° C. Mientras tanto, poner a hervir la solución de hibridación por 10 minutos poniéndola inmediatamente después en hielo manteniendo también las preparaciones sobre hielo mientras se aplica ésta.

7.- Secar las preparaciones. Con las preparaciones horizontales, agregar 75  $\mu$ l de solución de hibridación por laminilla y cubrir con un portaobjetos. Ubicar las preparaciones sobre agua hirviendo la placa caliente por un periodo de 6 minutos para desnaturalizar el DNA en el tejido sobre el portaobjetos. Poner en hielo por dos minutos.

8.- Colocar las laminillas en una cámara húmeda para la hibridación. Dependiendo del programa del usuario y los requerimientos en términos de sensibilidad, se pueden emplear los siguientes tiempos y condiciones de incubación:

- Toda la noche a 42° C produce óptimos resultados de sensibilidad.
- Toda la noche a temperatura ambiente, provee una buena sensibilidad cuando no está disponible una incubadora de 42° C.
- 3 horas a 42° C provee resultados rápidos con una moderada sensibilidad.
- 3 horas a temperatura ambiente, este método es para una visión rápida de las muestras sin una óptima sensibilidad o cuando no hay una incubadora de 37° C.

9.- Retirar cuidadosamente el cubreobjetos después de la hibridación. Lavar las laminillas de la siguiente manera \*:

2X SSC buffer	2 baños por 5 minutos cada uno
1X SSC Buffer	2 baños por 5 minutos cada uno
0.5 SSC buffer	2 baños por 5 minutos cada uno

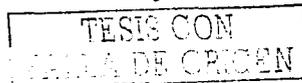
\* Secar las laminillas entre cada uno de los baños.

10.- Bloquear las laminillas en proceso de incubación con 1 ml por laminilla de buffer bloqueador 1X por 10 minutos a temperatura ambiente. Secar las preparaciones.

11.- Con las laminillas horizontales, agregar 0.5 ml de solución conjugada Anti DIG/AP. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Secar las preparaciones

12.- Lavar las laminillas en buffer TBS 1X a temperatura ambiente, 2 veces por 5 minutos cada uno. Secar las laminillas entre cada uno de los lavados.

13.- Con los portaobjetos horizontales, agregar 0.5 ml por portaobjetos de solución de desarrollo e incubar en una cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad por 2 a 3 horas.



14.- Secar las preparaciones. Detener la reacción por medio de lavados en buffer detenedor 1X por 5 minutos a temperatura ambiente.

15.- Secar las preparaciones. Sumergir las preparaciones por 30 a 60 segundos en Moreno de Bismark.

16.- Deshidratar la preparaciones: \*

Alcohol 95° C                      3 veces por 1 minuto cada una

Alcohol absoluto                3 veces por 1 minuto cada una

Xilol o un sustituto 4 veces por 1 minuto cada una

Cuidar que las preparaciones después del último xilol o sustituto no se resequen.

\* Si es utilizado un medio de montaje acuoso, se puede omitir la deshidratación.

17.- Agregar medio de montaje y cubrir

18.- Observar las preparaciones bajo un microscopio de luz en campo claro. Examinar los controles negativos y positivos primero para determinar que la reacción de hibridación fue satisfactoria (controles positivos) y que las anomalías dentro de la reacción fueran mínimas (control negativo).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN