

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**VIRUS DEL SINDROME DE TAURA (STV) Y VIRUS DEL  
SINDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV),  
AGENTES CAUSANTES DE EPIZOOTIAS EN LA  
CAMARONICULTURA MEXICANA (1996-1999).**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA**

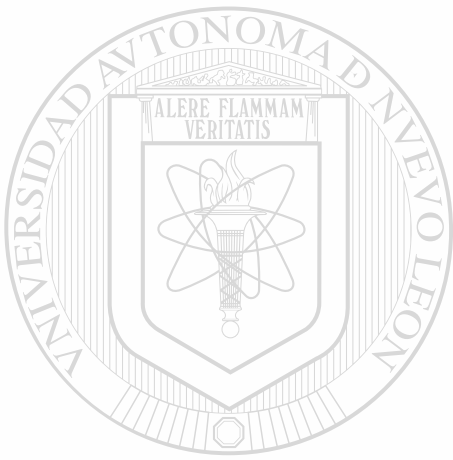
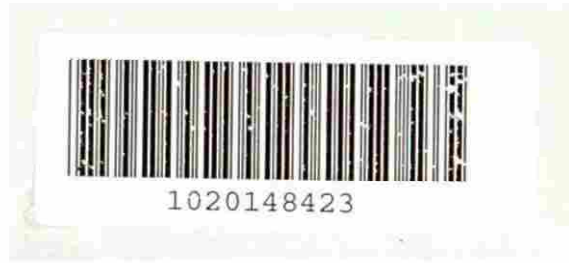
**M.C. LUCIO GALAVIZ SILVA**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. NOVIEMBRE DE 1999**

TD  
Z5320  
FCB  
1999  
G35

VIRUS DEL SINDROME DE TAURA (STM) Y VIRUS DEL SINDROME DE LA  
MANCHIA BLANCA (WSSV), AGENTES CAUSANTES DE EPIZOOTIAS EN  
LA CAMARONICULTURA MEXICANA (1996-1999)

1999



UANL

---

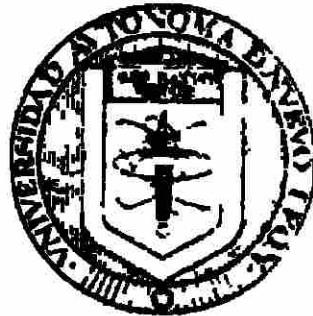
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



VIRUS DEL SÍNDROME DE TAURA (STV), Y VIRUS DEL  
SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV)  
AGENTES CAUSANTES DE EPIZOOTIAS EN LA  
CAMARONICULTURA MEXICANA (1996-1999)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

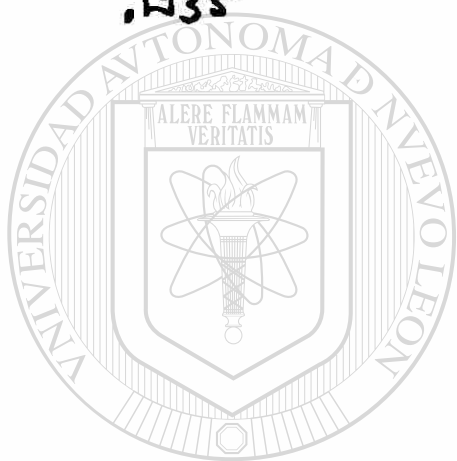
DIRECCIÓN QUE EN OPCIÓN AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGÍA

PRESENTA  
M. C. LUCAS GALAVZ SILVA

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L. NOVIEMBRE DE 1999



TD  
253 0  
FCB  
1999  
.G35



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**FONDO  
TESIS**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**VIRUS DEL SINDROME DE TAURA (STV) Y VIRUS DEL  
SINDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV), AGENTES  
CAUSANTES DE EPIZOOTIAS EN LA CAMARONICULTURA  
MEXICANA (1996-1999).**

---

**QUE EN OPCION AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA**

**M.C. LUCIO GALAVIZ SILVA**

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

NOVIEMBRE DE 1999

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**VIRUS DEL SINDROME DE TAURA (STV) Y VIRUS DEL  
SINDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV), AGENTES  
CAUSANTES DE EPIZOOTIAS EN LA CAMARONICULTURA  
MEXICANA (1996-1999).**

**DIRECTOR EXTERNO**

**DR. MARIO A. ROCHA PEÑA**

Handwritten signature of Dr. Mario A. Rocha Peña in black ink.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**COMISION DE EXAMEN**

**DR. JUAN MANUEL ALCOCER GONZALEZ  
PRESIDENTE.**

Handwritten signature of Dr. Juan Manuel Alcocer Gonzalez in black ink, positioned above a horizontal line.

**DR. ILDEFONSO FERNANDEZ SALAS  
SECRETARIO**

Handwritten signature of Dr. Ildefonso Fernandez Salas in black ink, positioned above a horizontal line.

**DR. ROBERTO MERCADO HERNANDEZ  
VOCAL.**

Handwritten signature of Dr. Roberto Mercado Hernandez in black ink, positioned above a horizontal line.

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

NOVIEMBRE DE 1999

## DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios, por permitirme alcanzar una meta más en mi vida profesional y académica y darnos la oportunidad de . También, para quien siempre quiso lo mejor para mí y porque gracias a sus incansables sacrificios logró el desarrollo de mi carrera, y, aunque no conozco una forma tangible de saberlo, sé que el cristalizar esta meta, le llena de profunda satisfacción. Gracias, Señor, por regalarme una Madre Santa:

CON AMOR

A MI MADRE

SRA. CRISTINA SILVA GARCIA (QEPD)  
(1922 1998)

CON PROFUNDA ADMIRACION Y RESPETO A MI PADRE

SR. JOSE GALAVIZ VILLA

También, para quienes nos enseñaron a caminar y a luchar, de quienes tanto hemos aprendido a soñar y trabajar para lograrlo, Gracias Señor, por su grande y querida compañía en esta vida:

A LA MEMORIA DE MIS HERMANOS CON  
TODO MI AGRADECIMIENTO Y ORGULLO

JOSE REYES  
(1945-1978)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NATALIA  
(1953-1999)

Indudablemente, este manuscrito y toda la labor que hay detrás de él, es dedicada a mi esposa, **Zinnia Judithy** a mis hijos, **Christopher Daniel** y **Lucio Abraham**, por apoyarme en los momentos difíciles de esta etapa de mi profesión, soportar tantas privaciones, ausencias y casi "olvidarlos" por muchos momentos. Gracias por su apoyo.

Sin olvidarme de mis hermanos: Macri, Felix, Pepe, Lauro y Taide. Los amo.



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a **Dios**, por permitirme practicar esta actividad, permitirnos conocer un poquito de su microcosmos, pero también, muy principalmente, por la compañía del actual equipo de estudiantes y profesionistas del Laboratorio de Patología Molecular, sin cuya labor dedicada y apasionada, no se hubieran logrado las metas propuestas como equipo:

**Raúl Gonzáles, Eduardo Morón, Gerardo de la Cerda; Narciso Salinas, Mónica Ramos, Narcedalia Abigail, Omar Carrizales, Cuauthemoc Ibarra, Jorge Javier, Raquel Aguilar, Roberto Mercado y Fernando Jiménez.**

Para el Dr. Mario A. Rocha Peña por permitirnos trabajar en su laboratorio, por el arreglo editorial, revisión y corrección a este manuscrito y por todas las invaluable enseñanzas que nos ha transmitido. Por ser un maestro ejemplar, Gracias Doctor.

Agradezco también a mi amigo, compañero de estudios de pregrado y Maestro Asesor; Dr. Juan Manuel Alcocer, quien dirigió este estudio, además de invitarme a iniciar el doctorado.

A la Dra. Cristina Rodríguez y al Dr. Reyes Taméz, por aceptarme en el Laboratorio de Inmunología, donde desarrollé gran parte de este trabajo bajo su asesoría.

A las Instituciones que de una u otra forma patrocinaron este estudio:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP/UANL). La Dirección General de Acuicultura y a la Dirección de Control y Sanidad Acuícola, ambas de la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, por el apoyo económico brindado a través del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y Sistema en Red de Diagnóstico, con el cual se adquirieron reactivos y equipo necesarios para el desarrollo de este y otros estudios paralelos, particularmente al Sr. Subsecretario, **Lic. Carlos Camacho Gaos**, por la confianza depositada.

Agradezco también a mis colegas, compañeros y **amigos** de trabajo del Laboratorio: Sra. Leobarda Flores, Marina Regalado, Margarita, Nené (Maria Elena), Mayra, Carlos, Asunción, Raquel, Juan Manuel Arredondo, Francisco Iruegas, Feliciano Segovia, Maria de la Paz.

También, mi mayor agradecimiento a mis suegros, Biol. Daniel Molina Valdéz y Pfra. Maria Elena Garza, por su asesoría y ayuda en la Cd. De Guaymas. Así como también, a Fausto Paredes y personas amigas del CRIP Guaymas, por facilitarme vehículos y asistentes técnicos de gran valía en los primeros muestreos realizados, Junio de 1991-1996, con los cuales se recorrió desde San Luis Río Colorado a Huatabampo en varias ocasiones.

## **AREA DE TRABAJO**

### **El presente trabajo se desarrolló en:**

Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular, INIFAP,  
bajo la dirección del Dr. Mario Rocha Peña.

Laboratorio de Inmunología, FCB, bajo la dirección del Dr. Juan  
Manuel Alcocer González.

Centro Nacional de Sanidad Acuícola, FCB, UANL.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# INDICE GENERAL

	Página
<b>PORTADA</b>	<b>i</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>AREA DE TRABAJO</b>	<b>iv</b>
<b>INDICE GENERAL</b>	<b>v</b>
<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>vii</b>
<b>ABREVIACIONES</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1) IMPORTANCIA	6
2) OBJETIVOS	6
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>71.</b>
CLASIFICACION DE VIRUS	9
II. EPIZOOTIOLOGIA Y CARACTERIZACION DE LAS ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL Y SIMILARES EN LA CAMARONICULTURA MUNDIAL.	9
1) SINDROME DE TAURA	9
A.- Etiología controversial	9
B.- Origen viral del síndrome de Taura	15
C.- Distribución geográfica del TSV en América:	19
D.- Caracterización molecular del TSV en casos de Hawaii y Ecuador:	20
E.- Situación del Síndrome de Taura en México:	22
2.- VIRUS DE LA NECROSIS HEMATOPOYÉTICA E HIPODÉRMICA INFECCIOSA (IHHNV):	23
A.- Descripción y distribución del IHHNV:	23
B.- Caracterización del IHHNV:	25
C.- Caracterización molecular de IHHNV y otros parvovirus relacionados:	26
3.- BACULOVIRUS QUE INFECTAN CAMARON	30
A.- Subgrupos y distribución en hospederos:	30
B.- Distribución y epizootiología de BP en México:	33
C.- Caracterización molecular de <i>Baculovirus penaei</i> :	36
D. Complejo de Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, WSBV, etc.):	38
a) Caracterización del complejo WSSV:	39
b) Distribución geográfica y epizootiología:	40
c) Presencia del complejo WSSV en el Continente Americano:	46
d) Caracterización molecular del complejo WSSV:	49
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>51</b>
I. MATERIAL BIOLÓGICO:	51
1) ORIGEN DE LAS MUESTRAS	51
A.- Primer muestreo (1996-1997):	51
B.- Diagrama de flujo de la metodología utilizada	52
C.- Segundo muestreo:	53
D.- Transporte de las muestras al laboratorio:	53
E) Examen histopatológico:	54
II. PURIFICACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO.	57
1.- Procedimientos de ultracentrifugación.	57
A.- Centrifugación diferencial:	57
B.- Extracción con freon:	57
C.- Centrifugación en gradientes de densidad discontinuos y lineales:	58
D.- Densidad del virus en gradiente de CsCl:	58
E.- Tinción negativa para microscopía electrónica:	59
III. ENSAYOS DE BIOINFECTIVIDAD	59

IV. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE (SDS-PAGE)	60
V.- EXTRACCIÓN DEL GENOMA VIRAL	61
VI. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> E HIBRIDACIÓN EN MEMBRANAS DE SOPORTE SÓLIDO	62
VII. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	62
A.- Extracción de ácidos nucleicos:	63
B.- Selección de iniciadores para la reacción:	63
C.- Control positivo:	64
D.- Control negativo:	64
E.- Amplificación del DNA del virus WSSV a partir del DNA total extraído de los tejidos de camarón por la técnica de PCR múltiple (Multiplex):	64
F.- PCR simple:	65
G.- PCR en dos pasos (Nested PCR):	65
H.- Amplificación del DNA de camarón como control:	66
I.- PCR en ejemplares del primer muestreo:	66
<b>RESULTADOS</b>	67
I. CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL SINDROME DE TAURA Y LA ENFERMEDAD QUE CAUSA	67
1.- Purificación de virus por gradientes de densidad:	67
A.- Gradientes de sacarosa	67
B.- Gradiente de cloruro de cesio:	68
C.- Purificación viral del material procedente de San Blas, Nayarit:	69
D.- Purificación viral del material procedente de Guasave:	70
E.- Purificación viral del material procedente de Los Mochis:	72
F.- Purificación viral del material procedente de San Luis Río Colorado:	74
2.- Microscopía electrónica de transmisión	76
A.- MET de las fracciones eluidas:	76
B.- MET de camarones infectados:	77
3.- Ensayos de bioinfectividad	78
A.- Inóculo viral procedente de Sonora y Sinaloa:	79
B.- Inóculo viral procedente de Nayarit:	80
4.- Hibridación de ácidos nucleicos	81
A) Hibridación en membranas de soporte sólido:	81
B.- Hibridación <i>in situ</i> :	82
5.- Microscopía de luz.	84
6.- Electroforesis por SDS-PAGE:	85
A.- Gradiente de sacarosa:	85
B.- Gradientes de cloruro de cesio:	87
7.-Extracción de RNA:	88
II. CARACTERIZACION DEL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA LA ENFERMEDAD QUE CAUSA	90
1. Signos macroscópicos del causados por el WSSV:	90
2.- Histopatología de WSSV:	91
3.-Histopatología del virus del síndrome de Taura:	93
4.- Reacción en cadena de la polimerasa.	95
A.- Calidad del DNA purificado con DNAzol:	95
B.- PCR simple o en un paso:	95
C.- PCR en dos pasos y multiplex:	97
<b>DISCUSIONES Y CONSLUSIONES</b>	103
<b>LITERATURA CITADA</b>	117



## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Familias de DNA virus que infectan camarón.	7
<b>Tabla 2.</b> Familias de RNA virus que infectan camarón.	8
<b>Tabla 3.</b> Sitios de muestreo y especies de camarón analizados. Junio 1996-Octubre 1997.	53
<b>Tabla 4.</b> Sitios de muestreo y especies de camarón analizados. Febrero-Julio de 1999.	54
Fig. 1. Sitios de muestreo correspondientes a Sonora. (A) Mapa 1: Golfo de Santa Clara, San Luis Río Colorado; y (B) Mapa 2: Estero Siari/Atanasia, Cd, Obregón.	55
Fig. 2. Localidades de muestreo de <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> , cultivados en Los Mochis y Guasave, Sinaloa.	56
Fig. 3. Localidad estudiada correspondiente a Ensenada de Los Cocos, Matanchen, San Blas, Nayarit (flecha).	56
Fig. 4. Esquema de amplificación por la técnica de PCR en dos pasos (Nested PCR) o PCR anidado).	66
Fig. 5. Purificación de partículas virales.	67
<b>Tabla 5.</b> Absorvancia de las fracciones obtenidas de los gradientes de CsCl del material colectado en Nayarit.	69
Fig. 6. Absorvancia y densidad en las fracciones de los gradientes eluidos de muestras de Nayarit. (A) Absorvancia de las fracciones. (B) La densidad del segundo pico corresponde a 1.32 g/ml <sup>1</sup> .	70
<b>Tabla 6.</b> Absorvancia de las fracciones s de los gradientes de CsCl en el proceso de purificación de virus a partir de casos crónicos observados en <i>L. vannamei</i> de granjas situadas en Guasave, Sinaloa.	71
Fig. 7. Absorvancia de las fracciones de virus purificadas del material colectado de Guasave.	71
<b>Tabla 7.</b> Absorvancia y densidad analizadas con muestras de <i>L. stylirostris</i> , cultivados en Los Mochis, Sinaloa. La densidad se calculó como se describe en la metodología.	72
Fig. 8 A. Gráfica de absorvancia de las fracciones obtenidas en gradiente de cloruro de cesio, a partir de las muestras colectadas en Los Mochis, Sinaloa.	73
Fig. 8B. Gráfica de la densidad (gml <sup>-1</sup> ) de cada fracción, obtenidos con base en las lecturas del índice de refracción.	74
<b>Tabla 8.</b> Lecturas de las muestras correspondientes a fracciones eluidas de camarones <i>L. vannamei</i> en la fase aguda del síndrome, originaria de San Luis, Río Colorado.	75
Fig. 9 A. Gráfica de absorvancia de las fracciones del material procedente de San Luis Río Colorado, Sonora. Note que este presentó un solo pico.	75
Fig. 9B. Gráfica de la densidad (g ml <sup>-1</sup> ) para determinar el valor correspondiente del IR para el tubo eluido de la fracción 5.	76
Fig. 10. Microfotografía tomada a 25,000 X de partículas virales icosaédricas teñidas con ácido fosfotúngstico, donde se observa la cápside electrolúcida y material genómico electrodenso.	77
Fig. 11. Partículas virales obtenidas de muestras de camarón infectado con VST, procedentes de Nayarit, Sonora y Sinaloa, México (25, 000 X).	77
Fig. 12. Ultraestructura de un corte de tejido de <i>L. vannamei</i> infectado experimentalmente, mostrando los viriones icosaédricos, que constituyen los cuerpos de inclusión citoplásmicos (V) y cristales de fosfato (F). 135, 200 X.	78
Fig. 13. Bioensayo efectuado con 15 <i>L. vannamei</i> , inoculados con partículas virales del material colectado en Sonora y Sinaloa, bandeadas en gradiente de cloruro de cesio. La tabla de datos muestra los parámetros físicos del agua del bioensayo (ma= mortalidad acumulativa).	79
Fig. 14. Índice de sobrevivencia en los bioensayos efectuados con inóculos de las localidades de estudio.	81
Fig. 15: Hibridación en membrana de soporte sólido realizado en las fracciones eluidas de los purificados virales con la sonda comercial DiagXotics	82
Fig. 16. Corte de tejido subcuticular de camarón <i>L. vannamei</i> cultivado en Nayarit.	83

Fig. 17. Hibridación <i>in situ</i> de células de tejido epitelial de la subcutícula de camarón.	83
Fig. 18. Corte de epitelio subcuticular de un control negativo de <i>L. vannamei</i> donde se muestra la apariencia normal del epitelio y tejido conectivo subyacente.	84
Fig. 19. Epitelio subcuticular con necrosis, enmarcada por la picnosis y cariorexis nuclear (flecha) junto con los cuerpos de inclusión citoplásmicos, esféricos, en la zona afectada.	84
Fig. 20. Gel de poliacrilamida con las proteínas correspondientes a las fracciones de sacarosa.	85
Fig. 21. Gráficas para determinar el peso de las proteínas del virus VST semipurificado en los geles de poliacrilamida.	86
<b>Tabla 9.</b> Datos numéricos de la migración electroforética del VST semipurificado en gradientes de sacarosa. Estos se aplicaron a la ecuación $y = ae^{bx}$ .	86
Fig. 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % de las fracciones eluidas de las bandas obtenidas en la purificación del VST en cloruro de cesio (Mr=Marcadores de peso molecular en kD).	87
<b>Tabla 10.</b> Datos numéricos de los valores obtenidos para el peso molecular (kD) de las proteínas electroforadas de las fracciones de cloruro de cesio.	88
Fig. 23. Gráficas del peso molecular de las fracciones eluidas de cloruro de cesio. (A) Gráfica del peso molecular con los datos originales y (B) Peso molecular estimado de acuerdo a la ecuación $y = 210.139 e^{0.029x}$ .	88
Fig. 24. Análisis del RNA obtenido de las fracciones eluidas en geles de agarosa.	89
Fig. 25 A. Electroforesis realizada con el producto de extracciones correspondientes a los muestreos	89
Fig. 26A. Manchas blancas en una exocutícula del cefalotorax de <i>L. vannamei</i> .	90
Foto 27 A y B. Ejemplares de <i>L. vannamei</i> con expansión de cromatóforos (camarón rojo o rosa), una de las expresiones clínicas de la enfermedad conocida como mancha blanca.	90
Fig. 28. Necrosis cuticular extensiva, sugestiva de una fase tardía del síndrome de Taura.	91
Fig. 29. Cuerpos de inclusión Cowdry, tipo A, producto de la multiplicación viral en el interior de los núcleos de filamentos branquiales en la fase temprana de desarrollo (flecha).	92
Fig. 30. Tejido conectivo adyacente a las glándulas antenales con cuerpos de inclusión Cowdry.	92
Fig. 31. Lesiones histopatológicas del virus de Taura.	93
<b>Tabla 11.</b> Resultados del examen histopatológico para detección del VST y WSSV.	94
Fig. 32. Amplificación por PCR del gen 18 S en muestras de camarón.	95
Fig. 33. Identificación de WSSV por PCR en muestras de camarón.	96
Fig. 34.: Identificación de WSSV por PCR en muestras de camarón y jaiba.	96
Fig. 35. Identificación de WSSV por PCR en muestras de camarón <i>L. vannamei</i> y jaibas de Sinaloa	97
Fig. 36. Identificación de WSSV por PCR multiplex	98
Fig. 37. PCR múltiple (multiplex) realizado en la modalidad de PCR en dos pasos	99
Fig. 38. Comparación de los amplicones de la cepa tailandesa, hondureña y del genoma viral de la cepa mexicana detectada en Ensenada de Los Cocos, Bahía de Matanchen	100

## ABREVIACIONES

ABREVIACION	SIGNIFICADO
°C	Grados centígrados, Celcius
A	Adenina
AAV	Virus adenoasociados
AN	Acido nucleico
BCIP-NBT	Bromo cloro indol fosfato/Nitro blue de tetrazolio
BMN	Necrosis baculoviral de la glándula del intestino medio
<i>BP</i>	<i>Baculovirus penaei</i>
BuDR	5' -bromo-2-deoxiuridinal
C	Citosina
CCV	Virus del bagre de canal
cDNA	DNA complementario
cm	Centímetro
CNSA	Centro Nacional de Sanidad Acuícola
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CsCl	Cloruro de cesio
DEPC	Dietil pirocarbonato
DIG	Digoxigenina-11' deoxiuridin trifosfato, Dig-11dUTP
dm	Diámetro
DNV	Densovirus
dsDNA	DNA de doble cadena
Ec-TSV	Aislado ecuatoriano del virus del síndrome de Taura
EDTA	Acido etilen diamino tetracético
EPC	Línea celular <i>Epitelioma papillosum cyprini</i>
EUA	Estados Unidos de Norteamérica
<i>Fa.</i>	<i>Farfantepenaeus</i>
<i>Fe.</i>	<i>Fenneropenaeus</i>
g	gramos
<i>g</i>	gravedades
G	Guanina
g ml <sup>-1</sup>	Gramos/ mililitro o por centímetro cúbico. Unidad de densidad
GV	Virus de la granulosis
h	Hora (s)
Ha	Hectáreas
HHNBV	Baculovirus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética
Hi-TSV	Aislado hawaiano del virus del síndrome de Taura
HPV	Parvovirus hepatopancreático
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
IHHNV	Virus de la necrosis hematopoyética e hipodérmica infecciosa
IRDO	Iridovirus de camarón

ITR	Secuencias palíndromes terminales
kD	Peso molecular de las proteínas en kiloDaltons
<b>ABREVIACION</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
kg	Kilogramo
kp/kpb	Kilobases/kilopares de bases
l	litros
<i>L.</i>	<i>Litopenaeus</i>
LOVV	Virus de la vacuolización del órgano linfoide
LPV	Parvovirus linfoidal
M	Concentración molar
<i>Ma</i>	<i>Marsupenaeus</i>
mA	Mili Amperios
MBN	Mug bean nucleasa
MBV	Baculovirus de <i>Penaeus monodon</i>
MET	Microscopía electrónica de transmisión
min	Minuto (s)
ML	Microscopía de Luz
ml	mililitro
mmol	Concentración expresada en milimoles
MNPV	Virus de la polihedrosis nuclear múltiple
NEC	Necrosis del epitelio cuticular
nm	Nanómetro
NOB	Baculovirus no ocluidos (no formadores de cuerpo de oclusión)
NPV	Virus de la polihedrosis nuclear
ORF	Marcos de lectura abierta
<i>P.</i>	<i>Penaeus</i>
PAV	Viremia aguda de los peneidos
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PBV	Baculovirus de <i>Penaeus plebejus</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PHRV	Baculovirus no ocluido hemocito infectante
Pm NOB II	Baculovirus no ocluido de <i>P. monodon</i> tipo II.
Pm SNPV	Virus de la polihedrosis nuclear simple de <i>Penaeus monodon</i>
PRDV	DNA virus de peneidos en forma de varilla
Pv SNPV	Virus de la polihedrosis nuclear simple de <i>Penaeus vannamei</i>
REO III	Reovirus tipo III
REO IV	Reovirus tipo IV
RNA	Acido ribonucléico
RPS	Rabdovirus del camarón peneido
RV-PJ	Virus baciliforme de <i>Penaeus japonicus</i>
SDS	Duodecil sulfato de sodio



SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio
seg	Segundo (s)
SEMBV	Baculovirus ectodérmico y mesodérmico sistémico
<b>ABREVIACION</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
SNPV	Virus de la polihedrosis nuclear sencilla
ssDNA	DNA de una sola cadena
SVCV	Virus de la viremia primaveral de la carpa
T	Timina
TAE	Amortiguador de Tris-acetato + ácido etilen diamino tetracético
TBE	Amortiguador de Tris HCl + ácido bórico + EDTA
TCBV	Baculovirus tipo C
TE	Amortiguador de Tris HCl + ácido etilen diamino tetracético
Tm	Toneladas métricas
TN	Amortiguador de Tris HCl + Cloruro de sodio (NaCl)
TS	Síndrome de Taura
TSV	Virus del síndrome de Taura
VMT	Virus del mosaico del tabaco
Vol	Volumen
WSBV	Baculovirus de la mancha blanca
WSSV	Virus del síndrome de la mancha blanca
YHV	Virus de la cabeza amarilla
μl	Microlitros
μm	Microgramos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## INTRODUCCION

El cultivo de organismos acuáticos en el mundo adquiere día con día mayor importancia por la creciente demanda de fuentes alimenticias que requiere la población. De acuerdo a la estadística mundial, la camaronicultura se ha convertido en una actividad sobresaliente, según Rosenberry (1997) y Jory (1998), la producción mundial de camarón en 1997 alcanzó 3,010,000 Tm. De esta cifra, 660,200 Tm (22 %) fueron cultivadas en granjas, con un abatimiento del 5 % con respecto a la producción de 1996. La producción en el Hemisferio Occidental se incrementó un 15 % con 198,200 Tm. Esta cifra récord correspondió al 30 % de la producción mundial, mientras que en el Hemisferio Oriental decreció un 11 % por tercer año consecutivo debido a varios problemas sanitarios, particularmente los virus cabeza amarilla (yellow head virus=YHV) y el de la mancha blancas (white spot baculovirus o white spot syndrome virus=WSBV, WSSV).

Existen granjas camaronícolas en 50 países de todo el mundo, pero la mayor producción en los últimos veinte años se centra en 10-12 países del Sudeste de Asia y América Latina donde fue dominada por dos especies, el camarón tigre (*Penaeus monodon* Fabricius, 60 %) y el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 27 %). En menor escala se cultivó a *Fenneropenaeus chinensis* Osbeck (= *orientalis* Kishinouye) (8 %), *Marsupenaeus japonicus* Bate (< 1%), *L. stylirostris* Stimpson (3 %) y *Fe. merguensis* de Man.

En el presente año, el camarón azul (*L. stylirostris*) fue la especie que predominó en el 95 % de las granjas de América Latina, en respuesta a la mayor resistencia natural al virus del síndrome de Taura (Taura syndrome virus=TSV), el cual abatió la producción de camarón blanco en el Hemisferio en 40-95 % durante el periodo comprendido de 1992 a 1996 (Lightner y cols., 1997).

Tailandia continúa siendo el líder en la producción camaronícola por sexto año consecutivo, pues a pesar de los serios problemas de enfermedades causados por virus, su producción disminuyó de 220,000 Tm a 160,000 en 1996, y en 1997 bajó hasta 150,000 Tm. El segundo mayor productor en 1997 fue Ecuador, con un récord anual de 130,000 Tm con 180,000 Ha en producción, aún después de sufrir severas pérdidas. México posee el segundo lugar (16,000 Tm, 8.1 %) en Latinoamérica, explotándose 20,000 Ha ocupadas por 220 granjas camaronícolas y 23 productores de larva, con el séptimo lugar a escala mundial. Incluso, el país podría ser uno de los líderes en el mundo, y estar en la cima de los productores, por lo cual se le llama uno de los "gigantes dormidos", junto con Brasil. Las expectativas en México son optimistas, quedando aún por explotar el 90 % de los litorales viables. Más, aunque el cultivo de camarón ha crecido considerablemente, los problemas sanitarios continúan siendo uno de los riesgos mayores en la pérdida potencial en la producción, pues desde el inicio de esta actividad, han surgido serios problemas patológicos, constituyéndose estos en factores determinantes en la evolución de la camaronicultura. (Jory, 1998).

---

Las especies mayormente cultivadas en la República Mexicana son *L. vannamei* y *L. stylirostris* (está última especie es la que se cultiva casi exclusivamente en el país en el presente año), figurando Sinaloa, Sonora y Nayarit como los Estados más productivos en cuanto a volúmenes y valor de producción (Rosenberry, 1997; SEMARNAP, 1998).

Paralelo al mejoramiento en las técnicas de cultivo con los sistemas de producción intensivos e hiperintensivos, existen factores de alto riesgo por las altas densidades poblacionales que se manejan, porque a pesar de ello, ocurren pérdidas notables por enfermedades bacterianas y virales en los cultivos comerciales (Couch, 1981; Lightner, 1985 y Luedeman y Lightner, 1992).

Las etiologías de mayor trascendencia por el impacto económico a escala mundial son las infecciones de los virus YHV y WSSV, introducidos de Asia a América. En Tailandia, el YHV causó la pérdida de 5,000 Tm en 1992, mientras que WSSV ocasionó pérdidas de 70,000 Tm (40 % de la producción) en 1996 (Dixon y Dorado, 1997; Lightner y cols., 1997; Wang y cols., 1999).

Los estudios sobre virus de camarón inician con el reporte de Couch (1974) sobre *Baculovirus penaei* (BP), este fue el primero de los virus que fue conocido en el camarón *Farfantepenaeus duorarum* Burkenroad del Golfo de México. A partir de ese estudio, la lista de virus se ha incrementado a casi 20 (y se espera la aparición de otros más), los cuales han sido reconocidos como patógenos importantes en las regiones donde se cultiva camarón (Lightner y cols., 1997).

Periódicamente ocho de ellos se han presentado regularmente en América y de ellos, cuatro han sido identificados como agentes etiológicos serios en una o más especies de camarones: el virus de la necrosis hematopoyética e hipodérmica infecciosa (infectious hypodermal and haematopoietic virus= IHNV), TSV, Parvovirus hepatopancreático (hepatopancreatic parvovirus= HPV) y BP. De estos, a dos de ellos, IHNV y TSV, se les reconoce por el impacto económico y mortalidad severa que han causado en las granjas camaronícolas, estableciéndose además en hospederos silvestres. HPV ha sido diagnosticado en *L. vannamei* y *L. stylirostris* silvestre, capturado en Perú, Ecuador y México, pero no se ha asociado a epizootias. Una de las regiones más severamente afectadas por el síndrome de Taura fue Ecuador, quien reportó pérdidas anuales que excedieron los 100 millones de dólares a partir de 1992 hasta 1996 (Brock y cols., 1995). En Texas, las pérdidas por esta enfermedad no han sido estimadas, pero las mortalidades alcanzaron del 80 al 90 % en el camarón blanco del Pacífico, el cual, irónicamente fue una cepa desarrollada para prevenir la aparición de otra enfermedad viral de carácter epizootico, substituyendo a la especie *L. stylirostris* la cual fue severamente afectada por IHNV (Dixon y Dorado, 1997).



El TSV fue encontrado recientemente en el Valle del Río Grande, Texas en 1995 en tanques de larvas de *L. vannamei*, así como en laboratorios de postlarva de Harlingen, Texas, en el condado Cameron County y dos granjas más en Matagorda. TSV también se ha detectado en cuatro granjas de South Carolina en junio de 1996. Todos los camarones de las granjas afectadas fueron destruidos. La importación de sementales y postlarvas son el riesgo más alto en la introducción de WSSV y YHV, similar a la introducción accidental del IHNV que abatió la producción del camarón azul en el Hemisferio Occidental. YHV, enzootico de China, Sudeste de Asia e India, ha sido detectado en camarones de Cameron County, Texas en 1995 (Lightner y cols., 1997; Alday-Sanz y Flegel, 1997).

En reunión de evaluación sanitaria de la industria camaronícola realizada en Monterrey N.L., la Dirección General de Acuicultura (SEMARNAP, 1996), estimó mortalidades de hasta el 80% en las granjas de Nayarit, durante el primer periodo de 1995-1996. Para el mismo período, el Estado de Sonora con 2,500 Ha en operación, registró pérdidas del 40% al 60 % en la producción. Desde 1984, cuando surgieron las epizootias por IHNV no se conocía otro patógeno mayor en el país. La necrosis cuticular se observó como causa de muerte en el 50 % de la producción de camarón en granjas de Nayarit. El síndrome invadió a 40 de las 90 granjas existentes (500 de las mil Tm que se estimaba cosechar). Al síndrome se le denominó "NEC" (necrosis del epitelio cuticular) y la causa o agente etiológico, permaneció sin identificarse (PINIAR, 1996).

A principios de marzo de 1999, se extiende la distribución geográfica del WSSV hacia Honduras y Nicaragua, donde causó serias epizootias en *L. vannamei* y *L. stylirostris*, este corresponde al tercer registro de WSSV en

América: Texas, South Carolina y Centro América (Lightner y cols., 1997; Alday-Sanz y Flegel, 1997).

La característica clínica macroscópica causada en común por los virus WSSV y TSV es la expansión de los cromatóforos, por lo cual, los ejemplares infectados se observan de color rojo o rosa en el primer y segundo mes de siembra y durante el proceso de muda (Sudha y cols., 1998).



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **1) IMPORTANCIA**

1. La Oficina Internacional de Epizootias, clasificó a las enfermedades causadas por **virus del síndrome de Taura** y **virus de la mancha blanca** (además del **virus de la cabeza amarilla**), como certificables; las cuales a la fecha no han sido reportadas en el país, hasta la presentación del presente manuscrito (OIE, 1999).

2. La camaronicultura es una actividad importante por la derrama económica hacia los núcleos poblacionales en la zona costera del Pacífico y las divisas que genera. Ocupa 20 mil Ha en producción, representando éstas, solo al 10 % de los litorales susceptibles a explotar. Por este motivo, requiere el apoyo de estudios sobre agentes patógenos, que en un momento dado, pueden poner en riesgo la producción.

3. Las expectativas para la industria camaronícola son alentadoras, pero requiere del apoyo de la sanidad acuícola para generar nuevos conocimientos realizados mediante estudios sobre patógenos virales. Esto debido principalmente por su rápida diseminación, colaborando a establecer oportunamente medidas de control o prevención, y así, evitar epizootias y elevadas pérdidas económicas.

## **2) OBJETIVOS**

1) Implementar métodos con bases moleculares, para la detección para las principales infecciones virales de importancia económica.

2) Establecer un diagnóstico sanitario con respecto a infecciones virales en la camaronicultura de México.

3) Caracterizar las diferencias en las cepas virales involucradas en las enfermedades de penaeidos y establecer nuevos registros.

## ANTECEDENTES

### I. CLASIFICACION DE VIRUS.

Los estudios sobre virus patógenos de penaeidos<sup>1</sup> han sido dirigidos a determinar la distribución geográfica, dispersión y cambios histopatológicos o citológicos. En cambio, los estudios sobre biología molecular son relativamente escasos, encaminándose particularmente a identificar las proteínas que constituyen la cápside o el tipo de ácido nucleico que poseen y sitios de restricción del genoma viral.

Los agentes etiológicos virales, reconocidos en el mundo son las siguientes (la abreviación del nombre común aparece en paréntesis):

Tabla 1. Familias de DNA virus que infectan camarón.

Nombre común en extenso	Siglas	Descriptor	Nombre científico sugerido
<b>Baculoviridae</b>			
<i>Baculovirus penaei</i>	BP	Couch, 1974	<i>P. vannamei</i> single nuclear polyhedrosis virus= Pv SNPV
Baculovirus de <i>P. monodon</i>	MBV	Lightner y Redman, 1981	<i>P. monodon</i> single nuclear polyhedrosis virus= Pm SNPV
Necrosis baculoviral de la glándula del intestino medio (baculoviral midgut gland necrosis)	BMN	Sano y cols., 1981.	---
Baculovirus tipo C de <i>P. monodon</i> (type C baculovirus of <i>P. monodon</i> ).	TCBV	Brock y Lightner 1990.	----
Baculovirus no ocluido hemocito infectante (?) (hemocyte-infecting nonoccluded baculovirus)	PHRV	Owens, 1993	----
Baculovirus de <i>P. plebejus</i> (Hess)( <i>P. plebejus</i> baculovirus)	PBV	Lester y cols., 1987	---
Baculovirus del síndrome de la mancha blanca	WSBV	Wongteerasupaya y cols., 1995	<i>P. monodon</i> non-occluded baculovirus type II= Pm NOBII).
Baculovirus ectodérmico y mesodérmico sistémico (systemic ectodermal and mesodermal baculovirus)	SEMBV	Wongteerasupaya y cols., 1995	----

<sup>1</sup> Los géneros de los penaeidos han sido actualizados con base a las recomendaciones de Pérez-Farfante y Kensley (1977).

Virus en forma de varilla de <i>P. japonicus</i> Bate.(rod-shaped virus of <i>P. japonicus</i> )	RV-PJ	Takahashi y cols, 1994	----
Baculovirus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética (hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus).	HHNBV	Huang y cols., 1995	----
<b>Iridoviridae</b>			
Iridovirus de camarón(shrimp iridovirus)	IRDO	Lightner y Redman, 1993	----
<b>Parvoviridae</b>			
Parvovirus linfoidal (lymphoidal parvo-like virus)	LPV	Owens y cols., 1991	----
Virus de la necrosis hematopoyética e hipodérmica infecciosa	IHHNV)	Lightner, y cols., 1983a	----
Parvovirus hepatopancreático(hepatopancreatic parvovirus)	HPV	Lightner y Redman, 1985.	----

Tabla 2. Familias de RNA virus que infectan camarón.

Nombre común completo	Siglas	Descriptor	Nombre científico sugerido
<b>Reoviridae</b>			
Reovirus tipo III (type III reo-like virus).	REOIII	Tsing y Bonami, 1987.	----
Reovirus tipo IV(type IV reo-like virus).	REO IV	Adams y Bonami, 1991	----
<b>Picornaviridae</b>			
Virus del síndrome de Taura	TSV	Lightner y cols., 1995; Brock y cols., 1995; Hasson y cols., 1995	----
<b>Rhabdoviridae</b>			
<b>Paramyxoviridae</b>			
Rhabdovirus de penaeidos(rhabdovirus of penaeid shrimp)	RPS	Nadala y cols., 1992	----
Virus cabeza amarilla	YHV.	Boonyaratpalin y cols., 1993; Flegel y cols., 1995.	----
<b>Togaviridae</b>			
Virus de la vacuolización del órgano linfoide(lymphoidal organ vacuolization virus).	LOWV	Bonami y cols., 1992.	----

En México existe relativamente escasa información referente a infecciones virales en el cultivo de camarón. Existen reportes de infecciones ocasionadas por el TSV, IHNV y WSSV (Lightner y cols., 1992b). Sin embargo, tal información está basada en sintomatología o semiología diversa, porque hasta la fecha, no ha existido un estudio con un protocolo metodológico que indique la ocurrencia de infecciones virales en las diferentes áreas camaronícolas del país.

A continuación se describe la epizootiología de los principales agentes virales que han impactado negativamente los cultivos de camarón a nivel mundial.

## **II. EPIZOOTIOLOGIA Y CARACTERIZACION DE LAS ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL Y SIMILARES EN LA CAMARONICULTURA MUNDIAL.**

### **1) SINDROME DE TAURA**

**A.- Etiología controversial:** Las primeras aportaciones concisas sobre el síndrome de Taura (TS) fueron aportadas por Jiménez (1992), quien la señaló como una nueva patología del camarón blanco, *L. vannamei* cultivado en granjas cercanas a la boca del Río Taura, Golfo de Guayaquil, Ecuador en Junio de 1992. Desde entonces, el TS se diseminó a otras granjas del Golfo de Guayaquil. En reunión emergente de expertos patólogos y camaronicultores -Taller sobre el Síndrome de Taura- (Lightner, Jones y Ware, 1994), se revisó el impacto negativo a la camaronicultura del Ecuador y la posible causa, pues el agente etiológico aún era desconocido. El síndrome inició con mortalidades de camarón cultivado en granjas cercanas al Río Taura durante Junio y Julio de 1992. En Noviembre del mismo año se determinó la ineffectividad del alimento medicado como control terapéutico para el TS y se planteó que una etiología tóxica podría ser la causa del TS. Durante Marzo y Abril de 1993 el TS se extendió hacia las localidades del Golfo de Guayaquil donde los camarones SPF (Specific pathogen free) fueron los más afectados en comparación con los silvestres. En Junio del mismo año la



distribución del TS abarcó hasta Tumbes, Perú. En Agosto la enfermedad se extendió a través de todas las granjas del Golfo de Guayaquil (Bahía de Caraquez, Provincia de Manibe), Tumaco, Colombia; Choluteca, Honduras y Oahu, Hawaii con efectos devastadores(Wigglesworth, 1994).

Se uniformizaron los signos macroscópicos del TS, estableciéndose de la siguiente manera: La fase aguda del TS tuvo un periodo incubación del 15-40 día de post siembra en las postlarvas (PL's) en estadios D tardíos, de la muda apreciándose un color rojizo por la expansión de los cromatoforos, acompañado de letargia y anorexia. Esta fase es seguida de la crónica, en la cual los ejemplares presentaron lesiones cuticulares melanizadas y múltiples y pueden estar activos con alimentación normal. Sin embargo, los episodios agudos pueden reaparecer en la siguiente muda. Los tejidos se observaron al microscopio con patologías de necrosis multifocal en el epitelio cuticular y subcutícula distribuidas en todo el cuerpo, agallas, apéndices, intestino anterior e intestino posterior. Las lesiones más características en la fase aguda fueron inflamación ausente o escasa, células necróticas con núcleos hipertrofiados o picnóticos, numerosos cuerpos de inclusión citoplásmicos esféricos, que van de eosinofílicos a basofílicos oscuros. En la fase crónica las lesiones mostraron infiltración hemocítica y melanización acompañada de colonización bacteriana de la cutícula, enfermedad de la "concha" y lesiones como las descritas en la fase aguda. A nivel ultraestructural los tejidos subcuticulares presentaron múltiples cuerpos de inclusión citoplásmicos, conteniendo agujas de cristales en una matriz amorfa, pero con ausencia de patógenos reconocibles (virus, bacterias o protozoarios). Los cristales en forma de aguja también se presentaron a nivel extracelular (Lightner y cols, 1994). Se concluye que la etiología del TS podría ser causada por:

- a.- Substancias tóxicas debido a los resultados negativos en los estudios de infectividad, sin apreciarse patógenos al microscopio de luz (ML) o electrónico de transmisión (MET), porque las epizootias del TS iniciaron

regularmente en áreas que reciben drenes de la agricultura y son más comunes en época de lluvias. También, la filtración con carbón activado del agua de los estuarios redujo la prevalencia, además de que el TS puede ser inducido en bioensayos con mezclas de fungicidas.

b.- La segunda etiología probable fue la infecciosa, destacándose dos razones principales, una de ellas fue la dispersión a través de todo el Golfo y distante de los plantíos de la agricultura, la segunda observación derivó de la extrema susceptibilidad de los lotes SPF que fueron más seriamente afectados en comparación con las PL's silvestres. La inclinación principal del grupo se dirigió hacia la etiología tóxica, señalándose dos hipótesis principales, la primera sobre el uso de fungicidas en la agricultura (afinidad por las partículas sedimentadas) y la segunda, el uso de fungicidas que bloquean la hormona de la muda (el TS es frecuentemente más común en las mudas de PL/juveniles), el síndrome fue directamente proporcional a la frecuencia de la muda, pues la severidad disminuyó en organismos más viejos, la presencia de TS aguda en el estadio D tardío de la muda y los cristales en forma de aguja correspondieron al fosfato de calcio.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Hasta esta fecha, el TS ha destacado como la enfermedad más significativa económicamente para las granjas donde se cultivó a *L. vannamei* en el Hemisferio Occidental, pues las pérdidas estimadas excedieron los 100 millones de dólares únicamente en Ecuador (Rosenberry, 1993), disminuyendo el pico de producción en aproximadamente 100 millones de Tm en 1991 a 70 millones en 1993. Las pérdidas de 30 millones de Tm, traducidas a un 30 % en la reducción en la producción de camarón con el precio en 1993, permitió calcular en más de 120 millones de dólares las pérdidas anuales causadas por esta etiología de causa no determinada (Rosenberry, 1993, 1994a, b).

Boyd (1994) estudió los probables pesticidas sospechosos que causan mortalidad en masa en camarones de las granjas del Golfo de Guayaquil. Señaló que es difícil garantizar una conclusión definitiva debido a que existe insuficiencia de información sobre el fenómeno, porque la baja sobrevivencia y síntomas característicos del TS empiezan al mismo tiempo en que las bananas son rociadas con pesticidas para controlar la sigatoka negra, asociando a dos de ellos como la causa principal: Calixin® (tridemprph, BASF) y Tilt® (propiconazole, Ciba-Geigy)- (propuesto asimismo por Lightner y cols., 1994 y Wigglesworth, 1994), de los cuales se conoce el efecto tóxico sobre los camarones, y que la combinación de ambos a bajas concentraciones producen síntomas (en camarones de prueba) similares a los observados en los camarones de las granjas afectados por el TS. Indicó que como no ha sido posible demostrar que el TS sea originado por una agente microbial, viral, metales pesados, disminución en el oxígeno disuelto o metabolitos tóxicos (nitrito, amonía y sulfuro de hidrógeno), parece razonable considerar la contaminación por pesticidas como la causa del problema. Por ello, recomendó realizar varios experimentos para aportar datos que confirmen esta sospecha, sugiriendo analizar agua filtrada y no filtrada, así como sedimento y camarones junto con pruebas de toxicidad de los pesticidas involucrados.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En Aqualab, una granja de Ecuador, se realizaron los ensayos de toxicidad con una mezcla de Tilt® (59.8 µg/l) y Calixin® (75 µg/l) adicionándolo al agua de los acuarios en concentraciones del 0 al 0.10 %. Al introducir juveniles de *L. vannamei* encontraron sobrevivencias del 50 % y 45 % en los ensayos de 0.05 % y 0.10 % de concentración en tres días de contacto. Realizaron repeticiones del experimento a diferentes concentraciones de salinidad, pesticidas y con alimento esterilizado y no esterilizado, concluyen que la causa se debía a los pesticidas. Otras hipótesis que fueron abordadas como la causa probable del TS fue una bacteria intracelular o rickettsia, el efecto de una degradación general del medio acuático de las granjas debido a la contaminación (Rosenberry, 1994) o bien, que exista más de un agente causal y que la causa varió con la región geográfica.

Brock y cols. (1995) presentaron los resultados concernientes a la posible causa del TS, sugiriendo un solo agente infeccioso y más específicamente a un probable virus, tentativamente llamado virus del síndrome de Taura. Reportan que el TS ocurrió en juveniles (0.1 a 5 g) de *L. vannamei* dentro de la segunda a cuarta semana en las salas de incubación ó de introducirse en los estanques. En los canales de corriente rápida (Hawaii), tardó de 9-23 días para que iniciaran las epizootias ( $19.7 \pm 11.4$ , n=6) en PL's 10-12. El curso de la enfermedad fue preagudo a agudo con picos de mortalidad de 5-7 días desde el inicio de la epizootia. La supervivencia de los cambios estimados debido al TS en los canales de corriente rápida en el cultivo intensivo (densidades elevadas de  $\geq 1,000$  camarones/m<sup>2</sup>) con la cepa mexicana SPF de camarón blanco, mostró una disminución hasta del 30 % al tercer día, 10 % al cuarto y 1 % de supervivencia al séptimo día. En comparación, la mortalidad acumulativa de camarones en estanques alcanzó del 80 al 90%. Las PL's de laboratorio fueron más susceptibles en comparación con las PL's silvestres. *L. vannamei* SPF fue altamente susceptible al mostrar elevada mortalidad.

---

La definición de los signos macroscópicos, histopatología y ultraestructura fue descrita por Lightner y cols. (1995) para consolidar estudios futuros sobre la enfermedad. Emplearon en este estudio *L. vannamei* con signos macroscópicos característicos de TS en la fase peraguda y de recuperación o crónica, colectados de granjas situadas en Ecuador, Perú y Colombia. Transportaron a los ejemplares en envases con fijador AFA-Davidson para estudios por ML y glutaraldehído 6% en amortiguador de fosfatos para procesos de MET. El criterio que señalan para uniformizar las diferentes fases de TS fueron los siguientes: Los signos macroscópicos inician en la fase de postlarva de 14-40 días, por eso, los camarones con TS son típicamente pequeños juveniles de 0.1 g a menos de 5 g, pero los camarones más grandes también pueden contraer la enfermedad con menor frecuencia. Los ejemplares moribundos muestran expansión de los

cromatóforos rojos en los apéndices, pero especialmente en uropodos, telson, pleopodos y en la superficie del cuerpo. La inspección en los apéndices más delgados como bordes de uropodos y telson revelaron signos de necrosis epitelial focal, por lo cual en Guayas se le llama "colita roja". Los camarones que mostraron estos signos de TS preagudo estaban típicamente en el estadio D tardío del ciclo mudal y por eso presentaron una cutícula suave y el intestino vacío. El TS preagudo severo culmina con la muerte durante el proceso mudal. Las frecuencias más elevadas de muda en juveniles menores de 5 g comparados con los juveniles mayores sugieren que la muda es importante en la patogénesis del TS. Los sobrevivientes desarrollaron lesiones cuticulares melanizadas, similares a la enfermedad bacteriana del caparazón, con o sin la cutícula suave y expansión de los cromatóforos rojos con un comportamiento normal y buena alimentación. Se propuso que es la segunda fases de la enfermedad y que los camarones presentan signos de recuperación o una forma crónica de TS. La caracterización histopatológica en cortes de tejidos teñidos con H & E se estableció de la siguiente forma: Las lesiones se caracterizan por áreas multifocales de necrosis en el epitelio cuticular de la superficie general del cuerpo, todos los apéndices, branquias, intestino posterior, esófago y estómago. Rara vez el epitelio tubular de las glándulas antenales es afectado. Frecuentemente el tejido conectivo subcuticular y fibras musculares estriadas basales adyacentes al epitelio cuticular estuvieron involucradas. Fueron características las lesiones multifocales cuticulares y extremadamente abundantes los cuerpos de inclusión esféricos citoplásmicos (1 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro). Estos últimos variaron en tinción observándose eosinofílicos a grisáceos o intensamente basofílicos. Los núcleos picnóticos o cariorécticos, no fueron teñidos por la reacción de Feulgen lo cual indica que no contienen cantidades significativas de DNA. Los cuerpos de inclusión le confieren a la lesión una apariencia de "pimentado" o "escopeteado" lo cual se considera patognómica en el TS. No se observó en las lesiones infiltración hemocítica u otros signos que señalen una respuesta inflamatoria del hospedero, lo cual distingue la fase peraguda de la fase crónica o de recuperación. La segunda etapa de la



enfermedad recuerda a la clásica enfermedad bacteriana del caparazón. Estas lesiones mostraron erosión de la cutícula, colonización superficial e invasión de las áreas afectadas por *Vibrio* spp. Frecuentemente se presentó un marcado infiltrado hemocítico, melanizado o no, basal a las lesiones. El estudio ultraestructural, de las lesiones focales en casos preagudos confirmó las observaciones realizadas por ML. Las inclusiones intracitoplásmicas esféricas fueron abundantes en los tejidos afectados (branquias y epitelio cuticular, subcutícula y músculo de apéndices) observándose de electrodensos a electrolúcidos. Se encontró que algunos contenían cristales en forma de aguja. Algunos especímenes examinados presentaron masas de estos cristales en el espacio hemocélico de las branquias, subcutícula y asociados a las fibras musculares adyacentes. En uno de los especímenes se detectaron los mismos cristales en el hemocele basal al epitelio y lumen de la glándula antenal. La morfología de estos cristales fue idéntica a la reportada para el fosfato de calcio en ciertos desórdenes metabólicos de vertebrados, por ello se presume que se trate de fosfato de calcio asociados a la patología de las lesiones causadas por TS. Consideran que en la etiología de esta está involucrado el metabolismo del calcio (calcificación y descalcificación de la cutícula durante la muda, según lo indicó la acumulación de cristales de fosfato de calcio en los tejidos y órganos afectados, lo cual apoya la hipótesis de la etiología tóxica. De esta manera, se crea una discordancia en la opinión de ambos expertos.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**B.- Origen viral del síndrome de Taura:** Los primeros indicios ciertos de la etiología del TS fueron indicados Brock y cols. (1995); en una serie de experimentos donde transfirieron el agente Taura a camarones juveniles sanos, alimentados con camarones positivos macerados, colectados en un brote epidémico. Los ejemplares inoculados mostraron la coloración característica de los cromatóforos, entre el día 4 y 5 de exposición al alimento infectado. Los camarones moribundos se apreciaron débiles, desorientados y con los cromatóforos expandidos. La histopatología patognómica de las lesiones se observó en la epidermis cuticular de los grupos de camarones expuestos, a



diferencia del grupo control. El porcentaje de la supervivencia en los ensayos fue del 20 y 25 % en cada grupo experimental de 20 *L. vannamei*, de los cuales los signos patológicos al TS se diagnosticaron en el 75 % y 80 % de cada grupo. En los dos grupos control encontraron supervivencias del 90 y 95 % con ausencia de positividad al diagnóstico microscópico del TS. Indicaron que el proceso de esterilización inactiva al agente TS en una segunda serie de experimentos con alimento esterilizado y no esterilizado. La tercer serie de experimentos tuvo el objetivo de conocer la susceptibilidad de las cepas mexicanas SPF de camarón blanco y azul, observaron que la primera fue altamente susceptible, mientras que la segunda fue considerablemente más resistente, con supervivencias del 20 % en *L. vannamei* y del 87 % en *L. stylirostris*. La cuarta serie de experimentos fue realizada por inoculación de tejido infectado desde  $10^{-4}$  a  $10^0$ , prefiltrado en membranas de 45  $\mu\text{m}$ . Observaron mortalidades en el grupo inoculado con  $10^0$  en el primer periodo de 24 h de post inoculación (PI) con los mayores picos de mortalidad acumulativa a las 48 h en todos los grupos experimentales. De acuerdo a estos resultados, concluyeron que:

- a.- el agente causal estuvo presente en forma activa en los tejidos de camarón colectados de las epizootias de TS,
- b.- el agente conserva la actividad después de congelarlo y almacenarlo a 0 °C,
- c.- el agente TS es fácilmente transmitido y resulta en signos patológicos típicos por ingestión oral, inoculación o exposición a los tejidos infectados con TS;
- d.- el agente puede transmitirse a juveniles de *L. stylirostris* ocasionándole las lesiones histopatológicas patognómicas, más sin embargo es mucho menos patogénico a esta especie de camarón;
- e.- la dilución de  $10^{-4}$  a  $10^0$  no disminuye significativamente la patogenicidad del TS;
- f.- el TS es inactivado por el calor y
- g.- el TS es más pequeño de 45  $\mu\text{m}$ .

Basándose en estas conclusiones, indicaron que el agente TS es un agente biótico, descartando los argumentos anteriores donde se indicaba una causa tóxica. La principal evidencia que aportaron estos investigadores en apoyo a la hipótesis, fue la observación ultraestructural de los casos preagudos a agudos de las lesiones en epizootias ocurridas en Honduras y Oahu, Hawaii. Los cristales minerales no fueron observados, siendo los cuerpos de inclusión la característica más prominente junto con cambios nucleares y citoplásmicos no específicos que indican degeneración y necrosis celular. En lugar de los cristales observaron partículas presumiblemente de virus individuales o en arreglos irregulares de racimos localizados en el citoplasma de las células epidérmicas y subepidérmicas necrosadas y dentro de los restos celulares en espacios intercelulares. Las partículas tenían un "core" opaco de 20 nm de diámetro y una superficie electrolúcida. El diámetro aproximado de los probables viriones fue de 30 nm, semejando a los virus Nodamura, sin embargo, el arreglo paracristalino típico de los Nodamura no fue observado.

Hasson y cols. (1995) demostraron por ML, MET y bioensayos el origen viral del TS. En el estudio utilizaron 5000 *L. vannamei* de la cepa mexicana SPF, manteniéndolos en acuarios con agua de mar sintética y alimento Rangen No 4. En el bioensayo 1 emplearon un homogeneizado crudo de camarón blanco ecuatoriano con TS, para inocular a los SPF, los cuales se sacrificaron en la fase aguda, homogeneizando los tejidos y purificando los agentes virales en sacarosa y CsCl. El segundo bioensayo se realizó con un inóculo del primero en la misma cepa de camarones, realizando ensayos de densidad flotante, tamaño de partículas, histopatología y MET. El tercer y último bioensayo se realizó con inoculación de un tercer lote de camarones SPF con fracciones purificadas del primer y segundo bioensayo. Los resultados obtenidos por este grupo de investigadores indicaron picos de mortalidad entre las primeras 24 y 48 h PI con declinación rápida. La mortalidad acumulativa osciló del 73 al 87 % entre cada población tratada. En contraparte, no ocurrieron mortalidades en el grupo control,

inoculado con solución salina 2 % o el inóculo control preparado con tejidos de la cepa SPF. Los signos clínicos observados en el grupo inoculado fueron letargia, nado lento, intestino vacío, opacidad muscular, cutícula suave (sugiriendo que la muda había ocurrido, sin embargo, no se observaron mudas en el acuario) y postura lateral previos a la muerte entre otros. Al final de los bioensayos, del 25 al 100 % de los sobrevivientes al tratamiento desarrollaron lesiones cuticulares multifocales, melanizadas similares a los casos de epizootias de las granjas. El análisis histológico de los ejemplares moribundos del día 1-3 PI reveló lesiones en grado moderado a severo con tres o más tejidos como blanco, incluyendo epitelio cuticular general del cuerpo, apéndices, branquias, boca, esófago, estómago e intestino posterior. Las lesiones fueron caracterizadas por picnosis nuclear y necrosis de las células del epitelio cuticular y subcutícula. Presentes en las lesiones estaban múltiples esferas basofílicas claras a oscuras de diámetro variable, interpretadas como cuerpos de inclusión intracitoplásmicos y núcleos cariorécticos. Ninguno de los camarones analizados en la declinación del pico de la mortalidad o desarrollo de las lesiones melanizadas externas presentó lesiones TS activas, sin embargo, las lesiones de la fase crónica, tipificadas por melanización focal e infiltrado hemocítico, fueron notadas en algunos de los sobrevivientes del tratamiento. Las lesiones al órgano linfoide fueron de moderadas a severas, caracterizándose por esferoides vacuolados en escaso o alto número. Al MET, las suspensiones virales purificadas por gradientes de sacarosa contenían numerosas partículas virales hexagonales, indicativas de una simetría cúbica y morfología icosaédrica. Los purificados de los casos hawaianos y ecuatorianos median 31 nm (punta a punta) con una media de 27-28 nm (lado a lado) con la técnica de difracción en réplica. Utilizando como referencia al virus del mosaico del tabaco (VMT) mostraron valores algo más grandes, con una longitud de punta a punta de 32 nm y 28 nm de longitud (lado a lado). El índice de refracción calculado para el virus ecuatoriano fue de  $1.337 \text{ g ml}^{-1}$  como promedio para la densidad flotante. Estos resultados llenaron los requisitos del postulado de River, señalando a los viriones de forma icosaédrica, de 31-32 nm de diámetro como al agente infeccioso

causal del TS, descartando la etiología tóxica de la enfermedad, llamándolo virus del síndrome de Taura, tal como había sido propuesto por Brock (1994).

Con este patógeno sumaron 20 los virus que afectan a los camarones peneidos, descubiertos a raíz de sus efectos negativos en la acuicultura (Lightner, 1996). Dos de ellos con efecto sumamente desbastador en América, han sido el IHNV y el TSV.

Ambos se han propagado extensamente debido al movimiento de los reproductores infectados utilizados para la acuicultura. El TSV y otros virus recientemente descubiertos en camarón silvestre y cultivado tienen el potencial para infectar los lotes de camarones americanos y causar un daño significativo hasta de \$ 9 billones en la camaronicultura y la industria acuícola, según estimaciones del Commerce Department's National Oceanic and Atmospheric Administration (United States Department Of Commerce 1997). Los Estados Unidos de Norteamérica importaron aprox. 2.5 billones de este producto en 1996, capturándose en el mismo año 224 millones de libras valuadas en 463 millones. La pesca de camarón en el Golfo de México osciló en el 82 % del total capturado, casi 202 millones de libras, equivalente a 392 millones de dólares. De ahí, el riesgo que podría ser catastrófico al introducir enfermedades virales (Smullen, 1997).

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**C.- Distribución geográfica del TSV en América:** En 1997 se actualizó la distribución del TSV en granjas camaronícolas del Continente Americano, la cual se extendió a las siguientes zonas: Ecuador (1992), Colombia, Ecuador, Perú (1993), Brasil, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras y EUA (Oahu, Hawaii y Florida) (1994), Belice, Ecuador, El Salvador, Honduras y México (Sonora, Sinaloa, Guerrero y Chiapas) (1995) y Belice, Costa Rica, Guatemala, México (Sonora, Sinaloa y Tamaulipas), Panamá y EUA (Texas y South Carolina) (1996). El diagnóstico utilizado por Hasson y cols (1997) incluyó el examen histológico e hibridación *in situ* de 98 muestras de *L. vannamei* constituidas de 1 a 50

ejemplares. Con los resultados obtenidos por hibridación concluyen que se apoya la distribución geográfica determinada anteriormente solo por histología indicando que se trata del mismo virus o cepas virales relacionadas, responsables de las epizootias ocurridas en el Continente Americano durante los cinco años anteriores.

Lotz (1997) sugirió que la pandemia causada por el TSV pudo ser controlada aplicando tácticas compensatorias, como son ajustar la alcalinidad y el pH e introducir a la estanquería larvas de mayor tamaño y edad manteniéndolas hasta antes de su introducción en sistemas de bioseguridad. Estudió la posibilidad de aumentar la resistencia incrementando el tamaño de *L. vannamei* o bien, determinar si la resistencia disminuye al incrementar el tamaño. En el experimento utilizó poblaciones SPF originarios de Sinaloa, México y conservados en Hawaii. La cepa de virus que empleó fue recuperada de una epizootia ocurrida en Texas en 1995. Los camarones fueron infectados *per os* permitiendo que los camarones se alimenten de tejido infectado o bien, inoculados por vía intramuscular con un extracto acuoso libre de células inyectado en el músculo abdominal. En los cuatro experimentos realizados concluyó que la resistencia al virus no se incrementa al incrementar el tamaño. La variante que encontró en el experimento 4 fue que la virulencia del TSV en camarones no solo dependía del tamaño entre 0.1 a 5 g, sino en un rango superior de 2 g en juveniles a adultos de 30 g.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### **D.- Caracterización molecular del TSV en casos de Hawaii y Ecuador:**

El TSV se considera un miembro más de los Picornaviridae o Nodaviridae, basándose estrictamente en las características morfológicas limitadas que se conocen. Bonami y cols. (1997) desarrollaron un protocolo de investigación para determinar las características físico químicas y morfológicas de dos aislados virales separados, purificados de *L. vannamei* originarios de Ecuador (Ec-TSV) y Hawaii (Hi-TSV), en brotes epizooticos ocurridos entre 1993 y 1994. Por MET determinaron la morfología icosaédrica del virus en rangos de 31 a 32 nm. La

densidad del virus determinada después de graficar los valores derivados del índice de refracción fue de  $1.338 \pm 0.001 \text{ g ml}^{-1}$ . La composición proteínica del virus analizada por electroforesis en geles estándar de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), fue de tres péptidos principales (24, 40 y 55 kD) en cantidades iguales de acuerdo a la misma intensidad de las bandas, además de un péptido menor (58 kD). La constitución genómica del TSV en los purificados de Ecuador y Hawaii fue RNA de acuerdo a los análisis espectrofotométricos y la relación  $A_{260} : A_{280}$  mayor a 1.9. En los geles desnaturalizantes estimaron una longitud aproximada de 9 kb al compararse con marcadores ss RNA (ácido ribonucleico de una sola cadena), siendo este sensible a la digestión con MBN y RNasa A y resistente a la DNasa en los purificados Hi-TSV y Ec-TSV sin observar diferencias en los patrones de migración.

Mari y cols. en 1998, lograron la clonación del genoma viral en purificados de Ecuador y Hawaii, para la elaboración de sondas a partir del ssRNA viral, transcribiéndolo en una doble hebra para producir cDNA de extremos romos y construir librerías en el plásmido pUC 18 o pBluescript II KS. Seleccionaron doce plásmidos recombinantes y los analizan con enzimas de restricción para determinar el tamaño de los insertos y el mapa de restricción. Seleccionaron a dos de ellos, el pP15 y pQ1 para el desarrollo de sondas. Marcan con DIG (digoxigenina-11 deoxiuridintrifosfato) los insertos de 1500 y 1300 pb denominados pP15 y pQ1, las cuales hibridaron con los purificados del virus y camarones infectados naturalmente.

El inserto de la clona TSV P15 obtenido en el estudio anterior, fue secuenciado por Nunan y cols. (1998), seleccionando dos iniciadores de acuerdo al análisis vertido del programa Primer 2. Los iniciadores denominados 9195 y 9992 fueron utilizados para realizar una reverso transcripción del RNA viral en



camarones *L. vannamei* SPF infectados experimentalmente utilizando 1 µl de hemolinfa como templado de RNA viral. En las reacciones de amplificación utilizan el "kit" Gene Amp EZ rTth RNA PCR (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT). Analizaron los resultados de la técnica desde el día 0 al 9 PI determinando la efectividad de la prueba, confirmada por "Southern blot" con sondas digoxigeniladas. En esta técnica obtuvieron productos amplificados de 231 pb en todos los casos estudiados.

**E.- Situación del Síndrome de Taura en México:** Los informes científicos sobre este problema en México no existen, solo algunas publicaciones informales en los diarios nacionales. Durante 1995-1997 se detectaron casos agudos y crónicos de un síndrome semejante en granjas camaronícolas de la República Mexicana, sin embargo, autoridades sanitarias (SEMRNAAP) negaron que se tratara del TSV, identificándola como NEC (necrosis del epitelio cuticular) y "síndrome similar al Taura". La enfermedad afectó al 50 % de la producción en Nayarit, invadiendo 40 de las 90 granjas que operaron en la entidad. A causa del NEC se afectaron 500 de las mil toneladas que se estimaban cosechar en el transcurso de las seis semanas que permaneció la situación (PINIAR, 1996). En Noviembre de 1995 también surgió un problema similar en San Blas, Pimientillo y Rosamorada, afectando a 200 toneladas del producto de camarón blanco. (PINIAR, 1996). Sinaloa y Sonora fueron otras dos entidades donde se abatió la producción del camarón blanco en porcentajes del 40 al 70 % de las granjas cultivadas. En Sinaloa, la enfermedad se presentó en camarones de 1 a 15 g durante el proceso de muda, la diferencia fue que esta última solo se había reportado en animales menores de 5 g. Mencionan que las causas de esta nueva enfermedad en el país pueden ser

- 1) cambios bruscos en la temperatura,
- 2) calidad de la semilla de laboratorio,
- 3) mala calidad de los alimentos,

- 4) calidad del agua y
- 5) presencia de agroquímicos en el agua.

El Colegio de Camaronicultores de Sinaloa A.C. (1995) informa que las 22 granjas representaron un total de 3,000 hectáreas y considerando que la producción promedio es de 700-800 Kg/Ha (\$ 30,000/tonelada) el valor estimado de pérdidas para el primer ciclo de 1995 sería de 45 a 65 millones de nuevos pesos (Abril a Julio de 1995).

## **2.- VIRUS DE LA NECROSIS HEMATOPOYÉTICA E HIPODÉRMICA INFECCIOSA (IHHNV):**

**A.- Descripción y distribución del IHHNV:** Lightner y cols. (1983a) describieron una nueva enfermedad de tipo viral a la cual llamaron necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa en *L. stylirostris*, *L. vannamei* y *P. monodon* capturados en Ecuador, Panamá, Costa Rica, Honduras, Texas, Florida, México y Tahití. Hasta esa fecha solo se conocían tres enfermedades de origen viral, BP, MBV y BMN.

Lightner y cols. (1992a), documentaron la introducción y diseminación del IHHNV a cultivos de camarón en las industrias del Noroeste de México y áreas del Golfo de California. En los casos de rutina provenientes de Puerto Peñasco, diagnosticados por la Universidad de Arizona desde 1973 a 1980, señalaron la ausencia de IHHNV en 1603 ejemplares de *L. stylirostris*, *Fa. californiensis* Holmes y *L. vannamei*. También revisaron 22 *L. stylirostris* y 2 *L. vannamei* en 1980-1985 del Golfo de California y 1500 ejemplares SPF de camarón azul capturados en México y criados en Marine Culture Enterprise durante 1980-1986 en Hawaii.

Todos ellos resultaron negativos. Sin embargo, en 1987 detectaron el primer caso de IHNV en *L. vannamei* de esta región en una granja en la Paz, Baja California. En el periodo de 1989-1990 identifican al virus en granjas de camarón azul ubicadas en Guaymas, Sonora y Mazatlán, Sinaloa. Incluso hicieron hincapié en que durante 1973-1990, el cultivo de camarón azul superintensivo en canales de corriente en Puerto Peñasco, no padecía de esta infección hasta mediados de 1990. Los camarones importados fueron - de acuerdo al criterio del autor- la fuente del IHNV que causó la epizootia en 1989-1990. En esta ocasión, los camarones importados provenían de Estados Unidos de América y América Central, y a su vez, distribuidos a varias granjas de las costas del Golfo de California.

Lightner y cols. (1992b) señalaron que la introducción de camarón para cultivo desde áreas remotas hacia Hawaii, México, Brasil y Norte América, mostró que ciertos patógenos de camarón principalmente el IHNV, MBV y HPV pueden ser fácilmente transportados con el envío de camarones vivos. Señalan que estas introducciones han causado enfermedades catastróficas. Por ejemplo, el MBV fue reconocido y descrito primero en *P. monodon* importado de Taiwán a Puerto Peñasco en 1976. Después, el MBV fue encontrado en *P. monodon* importado por Hawaii desde Taiwán, Tahití y Filipinas. De igual manera, el IHNV se descubrió en *L. vannamei* y *L. stylirostris* importado a Hawaii en 1980-1982 de granjas ubicadas en Florida, Panamá, Costa Rica, Ecuador y Thaiti. Señalaron a esta última especie como la más altamente susceptible con mortandades de hasta el 90.0 % y *L. vannamei* como portador asintomático. A HPV y MBV lo diagnostican en granjas del Norte y Sur América en camarones importados de Asia. El camarón blanco se encontró infectado por ambos virus.

**B.- Caracterización del IHNV:** Bonami y cols. (1990), purificaron y caracterizaron el IHNV con base en bioensayos, infectando a la especie susceptible *L. stylirostris* con *L. vannamei* positivos. Purificaron al virus en gradientes de sacarosa, CsCl, Celite 235 y Freon. Extrajeron el ácido nucleico en cloroformo-álcohol isoamílico y lo separaron por electroforesis en geles de agarosa. La densidad del ácido nucleico (AN) en CsCl la calculan en 1.3-1.4. Por tinción negativa, y empleando como comparador al VMT determinaron un tamaño de 20-23 nm con 5-6 lados, indicando que es un virus icosaédrico. Por SDS-PAGE separaron cuatro polipéptidos de 74, 47, 39 y 37.5 kD. Únicamente se presentó un tipo de AN en base al examen en un medio de disociación calentado a 60°C por tres min y corridos en SDS al 0.7% en geles de agarosa. Así mismo, detectaron una sola banda en el material tratado con metil-mercurio. El AN fue RNasa resistente y sensitivo a la nucleasa SI, por tanto, se dedujo que este era DNA de un solo filamento (ssDNA). Estos datos se corroboraron por la ausencia de hipercromicidad a 260 nm cuando se calentó suavemente. El tamaño calculado fue de 4.1 kb con marcadores dsDNA en agarosa al 0.7 %. De acuerdo a estas características se ubicó en la familia Parvoviridae.

Bonami y Lightner (1991) ubicaron al IHNV como un Picornaviridae, al cual detectan en penaeidos marinos cultivados en América, Asia y Medio Oriente. Mencionaron que el virus afecta al camarón azul y blanco del Pacífico Americano y *P. monodon* y *P. semisculatus* De Haan del Indopacífico, pero solamente en el camarón azul causó pérdidas serias, mientras en el blanco no ocasiona alguna sintomatología aparentemente. Diagnosticaron al virus en camarones silvestres cautivos únicamente de Malasia y Filipinas. Hasta entonces, caracterizaron al IHNV como un virus sin envoltura, tolerante a glicerol, de 20-22 nm, icosaédrico, replicación en citoplasma con una densidad en gradiente de CsCl de 1.34-1.40 g/ml

<sup>-1</sup>. Por electroforesis se cree que existen tres proteínas de cápside, dos menores y una mayor, de 36, 49 y 35 kD, respectivamente. Los análisis de AN obtenidos los consideraron inconsistentes, sugiriendo que no es DNA. Entrevén la posibilidad de que se trate de un Picornaviridae, pero no excluyen a Parvoviridae.

### **C.- Caracterización molecular de IHNV y otros parvovirus relacionados:**

El grupo de los Parvoviridae se incluye en la Clase II, donde se concentran aquellos que poseen un genoma de DNA monocatenario (ssDNA), de acuerdo a la clasificación de Baltimore y al International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, ver para mayores detalles a Voyles, 1993). Al filamento de DNA de los Parvovirus se le denominó banda negativa, o *minus*, debido a que su AN tiene secuencias que son el complemento del mRNA quien por convención en biología molecular, se le define como una banda positiva. Así, el mRNA es la figura central de la clasificación Baltimore. En los DNV (Densovirus, que es el género al que más se acerca el IHNV a la fecha) estudiados, ocurre la encapsidación separada en proporciones equimolares de bandas de cada polaridad (*plus* y *minus*) mostrando cada una capacidad codificante equivalente (Giraud y cols., 1992; Dumas y cols., 1992). A diferencia de estos DNV's, el IHNV no ocasiona tanta hipertrofia en los núcleos durante la infección y no encapsida filamentos de ambas polaridades en igual frecuencia, según considera Mari y cols. (1993).

En Parvoviridae se encuentran los géneros Densovirus, Dependovirus y Parvovirus. El género DNV incluye únicamente a los parvovirus autónomos de invertebrados a los cuales casi no se les ha investigado. En *Parvovirus* se encuentran los virus autónomos que se reproducen en mamíferos y en el género *Dependovirus* se incluyen a los virus adeno-asociados (AAV) con replicación

defectuosa los cuales requieren que la célula hospedante se infecte simultáneamente con otro DNA virus como Adenovirus o Herpevirus, auxiliándolos para la replicación. Por esta razón, al IHHNV se le ubica como miembro de los Densovirus (Mari y cols.; 1993).

Los DNV's identificados en invertebrados, causan enfermedades letales en grupos de Lepidópteros, Dípteros, Orthópteros, Dictyoptera y Odonata caracterizadas por la acumulación de partículas DNV en el compartimento nuclear. En los DNV's secuenciados, se han demostrado largas secuencias palindrómicas terminales (ITR, para el rescate del DNA viral de los plásmidos y para su replicación) y lo mismo se ha postulado para varios de ellos de acuerdo al análisis con enzimas de restricción. Estos *termini* contienen secuencias especiales autocomplementarias que le permiten plegarse sobre sí mismas para formar dos horquillas lobuladas dándole apariencia de "Y" ó "T", donde las secuencias en los extremos 3' y 5' difieren una de otra (Giraud y cols., 1992; Dumas y cols., 1992; Voyles, 1993). Todos los parvovirus secuenciados hasta 1991 presentan dos marcos de lectura abierta (ORF's) mayores dentro de la banda *plus*, de los cuales el ORF izquierdo codifica para proteína(s) no estructurales importantes para la replicación viral y el derecho para la mayoría de las secuencias expresadas en proteínas de la cápside (Anton y Lane, 1986).

Lu y cols. (1989) reconocieron la falta de un protocolo para el aislamiento, recuperación y purificación de grandes cantidades de virus en camarones infectados con IHHNV. Desarrollaron un método aplicado en branquias y gnatotorax de *L. vannamei* y *L. stylirostris* provenientes de Hawaii y Ecuador. Prepararon una solución homogeneizada al 33.0 % en amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH 7.5, centrifugan y el sobrenadante lo tratan con trifluoro-tricloro-



etano (Genetron 113). La purificación final consistió en un bandeo isopícnico en CsCl. Colectaron las fracciones registrando las lecturas a  $\lambda$  260-280 nm. Determinaron el tipo de AN por la prueba colorimétrica de orcinol y difenilamina como RNA, en cantidades de 4.7% considerándolo como un miembro de Rhabdoviridae. La densidad de la única banda la calcularon en  $1.33 \text{ g ml}^{-1}$ . El radio de las partículas virales fue de 0.69-0.77 lo cuál según ellos, revelan una población homogénea de partículas isométricas con un diámetro de  $19 \pm 1 \text{ nm}$ . al MET. Los intentos para infectar PL's de *P. stylirostris* y *P. monodon* con el producto purificado fueron negativos.

Loh y Brock (1990) encontraron que la línea celular de peces llamada *epitelioma papillosum cyprini* (EPC) de la carpa *Cyprinus carpio* Linnaeus es susceptible al virus del camarón penaeido IHNV. Reportaron crecimiento exitoso del virus lo cual, mencionan, promete servir con un sistema celular sensitivo el aislamiento y detección del IHNV. Conforme a sus observaciones, determinaron que el virus presenta RNA como AN y para confirmarlo, someten al virus a la presencia de BuDR (5'- bromo-2-deoxiuridinal), un antagonista del DNA. Como controles emplean al CCV (DNA del virus del bagre) y al genoma del virus SVCV (Viremia primaveral de la carpa, que presenta RNA). Observaron que la inhibición se presentó en la muestra de CCV, más no en la del SVCV y en el IHNV por estar constituido por RNA.

Lu y cols. (1991), infectaron la línea celular EPC con un homogeneizado libre de células provenientes de camarones infectados con IHNV. Al MET lo describieron como un virus cilíndrico con un extremo redondo y el otro plano, con una envoltura rodeando la nucleocápside y una estructura en forma de perilla en el extremo distal. Determinaron el diámetro de las partículas virales entre 65-77 nm.

Infectaron *L. stylirostris* y *L. vannamei* al inocularlos con 0.2  $\mu$ l del filtrado de camarones enfermos y lisados de células infectadas. Consideraron a la línea celular altamente sensitiva para la proliferación del virus.

Luedeman y Lightner (1992) desarrollaron un método para cultivos celulares primarios de camarones penaeidos. Evaluaron la hemolinfa de langosta, extracto de músculo de camarón, suero fetal bovino, hibridoma-suero bovino fetal, entre otros. Los mejores resultados fueron obtenidos con el medio de insectos Grace suplementado con hibridoma-suero bovino fetal. Las condiciones óptimas de osmolaridad para las células de camarón en este medio fueron de 700-750 mmol/kg a una temperatura de 25-28°C con incubación en una atmósfera normal. Con el método desarrollado, las monocapas de los cultivos primarios de células epiteloides de ovario de *L. stylirostris* y *L. vannamei* mostraron rutinariamente una confluencia del 80.0% en un periodo de dos días.

Mari y cols. (1993), investigaron la estructura genómica del IHNV para determinar la posible diferencia entre las cepas del virus, conocer su efectividad como cepa de referencia después de clonarla y diseñar una prueba de diagnóstico específico. El genoma purificado fue tratado con MBN, RNasa A y calor (94°C min.). Determinaron el peso molecular con los marcadores *Hind*III e *Hind*III/*Eco*RI. En geles de agarosa al 1% observan 3 bandas: (1) La banda A con 6.5-7 Kpb (no resistió a la digestión con MBN, es ssDNA, sensible al calor y es una banda *plus*), (2) la banda B con 4 Kpb (resiste la digestión con MBN, es dsDNA, sensible al calor, y se cree que es el resultado de 2 o mas moléculas de DNA asociadas por extremidades complementarias o secuencias palindrómicas) y (3) la banda C (no resiste la digestión con MBN, es ssDNA, y es el DNA encerrado mayormente en el virus apareciendo como una marca fuerte en el gel de

electroforesis, se considera una banda *minus*). con 2.6-1.5 Kpb. La digestión con RNasa no afectó a las bandas. Para clonación en el plásmido pUC18 emplearon solo la banda B obteniendo 500 colonias de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformantes. Efectuaron el mapeo de los insertos con enzimas de restricción para determinar la similitud entre los fragmentos. Localizaron el sitio de restricción *AccI*, *Bgl* II, *Eco* RI, *Hinc* II, *Kpa* I y *Pst* I. El DNA se insertó en el sitio *Sma* I del pUC18, flanqueado en la clonación múltiple por *Bam* HI y *Sac* I. Llamaron al inserto completo B54.5 (productos de la digestión con *Sac* I/*Bam* HI) y a sus 3 fragmentos los llaman BE1.0, BE2.3 y BE1.3, obtenidos de la doble digestión con *Eco* RI y *Bam* HI (presentaron un tamaño de 1.0, 2.3 y 1.3 kpb, respectivamente). Los fragmentos con IHHNV a concentraciones de 1.5 y 0.5 ng hibridaron con el fragmento B54.5 marcado con DIG, lo cual indicó que el DNA clonado correspondió al menos con una parte del genoma marcado. Los fragmentos BE1.3 y BE1.0 no hibridan, pero el BE2.3 sí lo hace, señalando la presencia de secuencias homólogas. El B54.5 también hibridó con el producto de digestión (*Bam*HI/*Eco*RI) de los plásmidos BA401, BA402, pero no con BG45 y DR22.

### **3.- BACULOVIRUS QUE INFECTAN CAMARON**

**A.- Subgrupos y distribución en hospederos:** La familia Baculoviridae está dividida en tres subgrupos: (1) Virus de la polihedrosis nuclear (nuclear polihdrosis virus= NPV) o Tipo A, (2) Virus de la granulosis denominados (granulosis virus=GV) o Tipo B y por último, (3) baculovirus no formadores de cuerpos de oclusión (non occluded baculovirus= NOB) llamados Tipo C.

En insectos se conocen más de 50 virus NPV que poseen una acentuada especificidad hospedatoria en plagas de importancia económica, por ello, actualmente numerosos estudios están orientados a emplearlos en el control

integral de insectos plaga. En el subgrupo de los NPV se encuentran aquellos virus cuyo cuerpo de oclusión poliédrico contiene nucleocápsides sencillas con envoltura y se denominan como SNPV, mientras que el otros virus desarrollan oclusiones virales que contienen múltiples nucleocápsides con envoltura y se designan como MNPV (Adams y Clintock, 1991). BP es el único baculovirus (no patógeno de insectos) caracterizado suficientemente a la fecha como para ser aceptado por el ICTV. Este se conoce desde 1974, cuando Couch lo diagnosticó por vez primera en *Fa. duorarum*. Es un baculovirus ocluido que desarrolla cuerpos de oclusión poliédricos en el núcleo de las células tubulares del epitelio hepatopancreático y en células epiteliales del intestino medio.

La familia se caracteriza porque los viriones presentan forma de varilla con envoltura, el cual encierra un genoma de DNA bicatenario o de doble filamento circular. En el caso particular de *BP*, las investigaciones señalan que este debe llamarse *PvSNPV* debido al hospedero donde desarrolla la forma más típica, *L. vannamei*, y por presentar los viriones con una cubierta o envoltura sencilla de acuerdo al ICTV. (Adams y Clintock, 1991; Bruce, 1993). En este escrito, aún se le seguirá denominando *BP* debido a que es el nombre con el que se conoce más comúnmente. Los baculovirus de hospederos no insectos, principalmente de Crustácea, como camarones, langostinos y cangrejos, se conocen desde 1972. Las baculovirosis se han reportado de ocho especies de camarones penaeidos en diversas localidades, como el Golfo de México, Hawaii, Japón, Sudamérica y Australia. Las infecciones baculovirales en no insectos, ocasionan significativos cambios citopatológicos. *BP* fue el primero que se describió en hospederos no insectos. Este, aunque no produce signos clínicos de infección en adultos o larvas de penaeidos, los cuerpos de oclusión tetraédricos pueden observarse en las

células hepatopancreáticas y cuando la infección es fuerte, los cuerpos de oclusión aparecen en heces.

La infección causada por *BP* afecta la glándula digestiva (hepatopáncreas) y trae como resultado la producción controlada de cuerpos tetraédricos de oclusión que contienen múltiples viriones embebidos. Los viriones presentan una nucleocápside rodeada por una envoltura de forma trilaminar. La nucleocápside mide aprox. 260 nm de longitud y 44.2 nm de diámetro. En los cortes ultraestructurales se observa una protrusión en forma de perilla desde la base de la nucleocápside, la cual también ha sido observada en el Baculovirus del insecto *Autographa californica* Speyer. El virion inyecta su DNA en el núcleo de la célula hospedante a través del poro nuclear después de entrar al hepatopáncreas presumiblemente por viropexis o por fusión del virión en sitios específicos de la membrana. Una vez integrado en el genoma de la célula hospedante, el virus dirige una serie de cambios morfológicamente reconocidos al MET. Estos cambios caracterizan la infección celular durante la producción de viriones maduros y cuerpos de oclusión tetraédricos. Los estadios son (1) hipertrofia nuclear y disminución de la cromatina, segregación del nucleoplasma en regiones del estroma fibrilar, (2) aparición de viriones con y sin envoltura, proliferación de la membrana nuclear externa y aparición de una extensiva membrana laberíntica contigua al retículo endoplásmico y (3) en las infecciones avanzadas ocurre el crecimiento, coalescencia, y paracristalización de los cuerpos de oclusión tetraédricos que miden desde 0.5 a 12  $\mu\text{m}$  (Couch, 1974). Los viriones no ocluidos y los cuerpos de oclusión tetraédricos se liberan de las células epiteliales lisadas y llegan al lumen del intestino medio para salir por el ano junto con las heces fecales (Bruce, 1993).

**B.- Distribución y epizootiología de BP en México:** Lightner y Redman (1989) reportaron el primerr hallazgo de *BP* en México y describen características únicas en los crustáceos infectados, *L. stylirostris*. Encontraron cuerpos poliédricos de oclusión en larvas cultivadas cerca de Guaymas, Sonora relacionadas con mortandades hasta del 100.0 % en estanques. La infección apareció primero en protozoaeas y se incrementó en el estadio de misis hasta PL´s con una frecuencia del 80-100.0 %. Posteriormente la prevalencia y severidad decreció en los juveniles de 45 días hasta que fue indetectable. Las características al MET concordaron con las descripciones anteriores en *Fa. duorarum*, *Fa. aztecus* y *P. marginatus* Randall . Las características únicas que presentó la infección fue la gran afinidad de los viriones por los micro filamentos nucleares.

Overstreet y cols. (1988) mencionaron que las infecciones por *BP* han impactado históricamente la producción camaronera de larvas a nivel de laboratorio y de estanques, debido a las alteraciones histopatológicas y mortandad en al menos cuatro especies de camarones incluyendo a *L. vannamei*. Para corroborar la patogenicidad de este virus, infectaron experimentalmente a *L. vannamei* de laboratorio en las fases de PL<sub>1</sub> y PL<sub>2</sub> con rotíferos libres del virus alimentados con algas y a los estadios de misis M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> y PL<sub>1</sub> con tejidos de camarón sano y algas. Por otra parte, alimentaron a los estadios PL<sub>3</sub> con rotíferos infectados con *BP* y a M<sub>1</sub> y PL<sub>1</sub> con tejidos de camaron infectado. Cuando la fuente de infección fueron adultos y juveniles para alimentar a PL<sub>3</sub>, los camarones mostraron una infección patente con núcleos hipertróficos y oclusiones poliédricas virales a los 5-6 días PI. El examen al MET y ML mostraron infección viral extensiva en muchas células del intestino anterior y casi el 80-90.0 % de las células tubulares hepatopancreáticas mediales y proximales. La prevalencia obtenida en el



bioensayo fue del 100 %, pero en los estadios larvarios de *L. vannamei* el virus fue especialmente patógeno.

Krol y cols. (1990), observaron un reovirus en el intestino medio y epitelio de hepatopáncreas durante un estudio sobre el efecto de *BP* en larvas de camarón blanco. El reovirus solo se presentó en ejemplares infectados experimentalmente con *BP*. Durante su investigación, infectaron primero a los rotíferos *Brachionus plicatis* con *BP* y transfirieron la infección a 14 nauplios de *L. vannamei* en los conos Imhoff en periodos de 26 h de contacto. Nueve de los crustáceos desarrollaron la infección con evidencias clínicas y 5 de ellos una infección por Reovirus. El *BP* se presentó al ML en cuerpos poliédricos de oclusión y viriones en el núcleo de las células epiteliales del hepatopáncreas e intestino medio. Mientras, la infección por el reovirus se manifestó en racimos de viriones en el citoplasma del hepatopáncreas y células epiteliales del intestino medio anterior pero más frecuentemente en las células de reserva R y células fibrilares F. De acuerdo a la forma, tamaño y localización, este último correspondió al grupo de los Reovirus pero mencionaron que es necesario realizar estudios de aislamiento, purificación y análisis del AN para confirmarlo. Por otra parte, consideraron que la infección experimental con *BP* muestra una patogenicidad limitada debido quizá al escaso tiempo de desarrollo. Indicaronnaron que el reovirus es uno de los factores que predisponen la adquisición de enfermedades.

Le Blanc y Overstreet (1990), concluyeron que la edad influencia la infección con *BP* de acuerdo a los experimentos realizados en 7 grupos de edad. Los *L. vannamei* más viejos (PL's mayores de 63 días) fueron menos susceptibles a desarrollar infecciones patentes en comparación con los jóvenes. La prevalencia de las infecciones nuevas disminuyó con la edad, algunas veces hasta cero. El período

prepatente se incrementó unos días en las infecciones de los grupos con mayor edad. El número relativo de células hepatopancreáticas afectado fue del 75-80% en las PL's de 3 días hasta menos del 5% en los individuos entre 63-157 días. Las infecciones no fueron detectables en los crustáceos entre 325-454 días de edad.

Le Blanc y cols. (1991), reportaron la relativa susceptibilidad que presentó *Fa. aztecus* a la infección experimental con *BP*, en base a reportes anteriores en 13 especies de penaeidos del Continente Americano, en los cual varió la severidad de las epizootias, no solo de acuerdo a la especie, sino también al estadio y condiciones de cultivo. Además realizaron este trabajo al observar que *P. setiferus* Linnaeus, originarios de los estuarios de Mississipi no habían presentado infecciones por *BP* en contraste con los juveniles de *Fa. aztecus* de la misma localidad, quienes exhibieron infecciones leves o moderadas, lo cual tentativamente sugirió que *P. setiferus* fue una especie más resistente al virus. En su estudio infectaron experimentalmente a *Artemia franciscana* para dosificar las infecciones en *Fa. aztecus* y *P. setiferus*. La primer especie presentó un 25% de infección mientras que la segunda no desarrolló signos de la virosis. Concluyeron que *L. stylirostris* no es un hospedero natural aunque el resultado no fue contundente debido a lo pequeño de la muestra (n=18).

Lightner (1993), reportó que los baculovirus son entéricos, con excepción de HB (Baculovirus hemocito infectante de *P. monodon* y *P. esculentus* Haswell, Haswell; ahora PHRV) que se presenta en hemocitos. Los baculovirus causaron severas epizootias en PL's, larvas y juveniles. Sugirió que el diagnóstico de *BP* se debe fundamentar en la observación de las oclusiones tetraédricas en hepatopáncreas, intestino medio o heces. Mencionó que los cuerpos de oclusión son eosinofílicos, triangulares, de 17  $\mu\text{m}$ , ocurrió dentro de los núcleos

hipertrofiados de los túbulos epiteliales del hepatopáncreas, células epiteliales del intestino medio y su distribución geográfica incluyó a Ecuador (*L. vannahae*), Golfo de México (*Fa. aztecus* y *Fa. duorarum*) y Hawaii.

**C.- Caracterización molecular de *Baculovirus penaei* :** El genoma de BP ha sido bastante estudiado en el ámbito biológico, bioquímico y genético. Incluso se conoce la composición bioquímica de la polihedrina de los cuerpos de oclusión. Summers y Smith (1987), determinaron la conformación de la polihedrina y su relación con los baculovirus de insectos encontrando algunas reacciones cruzadas con la del baculovirus de *Autographa californica* y de *Trichoplusia ni* (Hübner), lo cual confirma la presencia de secuencias primarias similares o de sitios antigénicos entre la polihedrina de BP y de la de otros baculovirus de insectos (Vialard y Richardson, 1993).

El ds DNA de BP, posee un tamaño de 114 kb y características estructurales similares al DNA de los baculovirus de insectos. El DNA presenta 50-100 genes, los cuales, durante la infección de una célula inician un ciclo de transcripción en cascada, gobernado por genes tempranos, tardíos y muy tardíos. La transcripción temprana es mediada por la RNA polimerasa II de la célula hospedante y empieza antes del inicio de la replicación del genoma. La transcripción tardía, en contraste, ocurre después de la replicación y depende de la presencia de una RNA polimerasa que es  $\alpha$ -amanitina e inicia la transcripción desde dentro de una secuencia promotora y contribuye a la transcripción de la polihedrina y del gen p10. En esta fase también se transcriben las proteínas estructurales de la envoltura viral. Otro de los productos de los genes tardíos es la glicoproteína viral gp64 y la proteína mayor de la cápside. Ambos son genes esenciales. (Volkman y Keddie, 1990; Bishop, 1992; Glocker y cols., 1993).

Mari y cols. (1993) realizaron la caracterización y clonación parcial del genoma del Baculovirus de *P. monodon* (PmSNPV=MBV), el cual es un virus ocluido, enzootico en camarones silvestres y cultivados del Sureste de Asia. Aislaron y purificaron al MBV determinando que este presentó forma de varilla, con envoltura y tamaño de 265-282 nm de longitud x 68-77 nm de diámetro. Observaron que presenta además un único apéndice en cada extremidad. La superficie presentó un aspecto estriado con una estructura en forma de gorra en cada extremo. Encontraron que las subunidades del cuerpo de oclusión midieron 22-23 nm de diámetro con forma de icosaedro. Estas subunidades, que es polihedrina, exhibieron al menos un polipéptido mayor de 58 kD por SDS-PAGE. El AN presentó forma superenrollada al MET y demostraron que es DNA mediante enzimas de restricción, pero debido al superenrollamiento de las moléculas de DNA no fue posible medir el peso total del genoma. Obtuvieron cinco fragmentos de restricción (21 o más, 9, 6.5, 3.5 y 2.8 kpb denominándolos con las letras A, B, C, D y E, respectivamente) con la endonucleasa *Bam*HI, separándolos en geles de agarosa para clonarlos en el sistema pUC18-DH5 $\alpha$ . Determinaron el número de sitios de restricción para los fragmentos B, C, D y E con las enzimas *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Bg*III, *Xba*I, *Hinc*II, *Sal*I y *Sac*I. Establecieron el mapa de restricción para los insertos que presentaron de 8.5 a 2.8 kb correspondiendo al fragmento de restricción clonado *Bam*HI. Por esta característica proponen que se incluya en el subgrupo A, subtipo SNPV de la familia Baculoviridae y se nombre *Pm*SNPV de acuerdo a la guía del ICTV.

Bruce (1993) realizó la caracterización y clonación parcial del genoma de *BP* y además determinó la aplicación de la sonda genética para detectar al virus en muestras de camarón mediante hibridación "dot blot" y en cortes histológicos. Caracterizó los fragmentos de DNA obtenidos de la clonación del genoma clonado

y digerido con las endonucleasas de restricción *Bam*HI en el vector pUC18. Determinó ocho fragmentos de restricción, los cuales presentaron 11.7, 8.2, 8.2, 4.8, 4.0, 4.0, 2.9 y 1.1 kpb con sitios de digestión *Eco*RI/*Hind*III. Entre las características físicas encontró que las subunidades de polihedrina midieron 17-19 nm; nucleocápside de 306-312 nm de longitud por 62-68 nm de diámetro. Las partículas envueltas midieron 312-320 nm de longitud y 75-87 nm de diámetro. Designó a la prueba génica B1.23; B3.9, B4.9, B8.4a y B8.4b, con un tamaño aproximado de 1.23, 3.9, 4.9, 8.4 y 8.4 kpb, respectivamente. La sonda génica mostró reacción positiva con el DNA de BP obtenido de especímenes en Hawaii y Mississippi, con los cuerpos de oclusión de cepas provenientes de Hawaii, Mississippi y Ecuador y con muestras de heces y tejidos de camarones infectados con BP, pero no reaccionó con los virus REO, HPV e IHHNV. El fragmento de restricción que mostró reacción en cortes de tejidos fue el B1.23. Mientras, las pruebas con los fragmentos B8.4A y B8.4B mostraron reacciones moderadas. El resto de los fragmentos presentaron reacción leve. Esta técnica fue altamente específica para camarones de varias especies, observando reacciones negativas con los virus MBV, Tipo C, HPV, cabeza amarilla e IHHNV.

---

**D. Complejo de virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, WSBV, etc.):** Inicialmente conocido como WSBV, este virus fue clasificado en el género NOB, dentro de la subfamilia Nudivaculovirinae, familia Baculoviridae, según el 5º Reporte del ICTV (Francki y cols., 1991). Sin embargo, en el 6º Reporte de la ICTV la subfamilia y el género citados, no se agregan a la lista, quedando como virus de invertebrados sin asignación (Murphy y cols., 1995).

Otros nombres que le han sido asignados han sido: Baculovirus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética (IHHNBV), causante de la enfermedad epidérmica explosiva del langostino ocurrida en 1993-1994 en China, (Huang y cols., 1994; Cai

y cols., 1995) Virus en forma de varilla de *Ma. japonicus* Bate (Inouye y cols., 1994; Takahashi y cols., 1994) ) Baculovirus sistémico ectodérmico y mesodérmico (SEMBV) del camarón tigre *P. monodon* de Tailandia (Wongteerasupaya y cols., 1995). Baculovirus de la mancha blanca (WSBV), asignado por Wang y cols. (1995) y Lo y cols. (1996). Los agente (s) virales de esta enfermedad son muy similares en tamaño (80 a 120 x 275 a 360 nm), rango geográfico, signos macroscópicos y microscópicos, por lo cual, las enfermedades causadas por estos baculovirus no ocluidos se agrupan junto con los diversos miembros del grupo WSBV, bajo el nombre de síndrome de la mancha blanca (WSSV), de acuerdo a la recomendación de Lightner (1996).

**a) Caracterización del complejo WSSV:** Debido a la amplia distribución geográfica y de hospederos que actualmente presenta, así como a la variación morfológica ultraestructural y secuenciación génica, en el complejo WSSV se reconocen aproximadamente 15 variedades (aislados geográficos o cepas), con el mismo número de iniciadores reportados en la literatura. Inouye y cols. (1994) describieron al agente causal como virus no ocluidos, en forma de varilla, con envoltura. El virion maduro midió 404 x 152 nm. El genoma viral fue identificado como DNA no segmentado de doble cadena, aproximadamente de 163 kpb. Con esta base, sugirieron que sea ordenado dentro de los Baculoviridae, subfamilia Nudivaculovirinae. Redesignaron al virus como PRDV (Penaeid rod-shaped DNA virus, anteriormente RV-PJ). Wongteerasupaya y cols. (1995) describieron viriones como SEMBV, los cuales midieron 276±121 nm. la nucleoclápside de lo viriones completos de 201 ± 89 nm y las cápsides vacías de 302 ± 85 nm. Park y Lee (1996) refirieron un estudio más, derivado de epizootias en camarón, en el cual encontraron viriones con un tamaño de 375 x 167 nm; la nucleocápside midió de 290 x 75 nm. Takahashi y cols. (1996) observaron al MET un agente viral que



causó patología similar a los mencionados. En este caso, la longitud y anchura al MET fue de 375 x 167 nm y la nucleocápside de 290 x 75 nm. Consideraron que este difirió morfológicamente al RV-PJ estudiado en Japón. Durand y cols. (1997) estudiaron la ultraestructura de un aislado tailandés de WSSV originario de *P. monodon*, inoculándolo en *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Al MET, los viriones fueron observados de forma cilíndrica, con una extensión apical de la envoltura. La nucleocápside fue cilíndrica, con extremos asimétricos y apariencia segmentada. Indicaron que la morfogénesis viral inicia con la formación de membranas *de novo* en el nucleoplasma y por la elaboración de túbulos largos, segmentados, vacíos. Estos túbulos se rompen después en fragmentos para formar las nucleocápsides vacías. Después de eso, las membranas envuelven las cápsides, dejando una extremidad abierta. Las nucleoproteínas, que tienen una apariencia filamentosa, entran a la cápside a través del extremo abierto. Cuando el core está completamente formado, la envoltura se cierra en el extremo abierto y forma la cola apical del virion maduro.

---

**b) Distribución geográfica y epizootiología:** La enfermedad viral más reciente en América es la denominada WSSV, aunque el origen de esta inició en Asia. Los integrantes del complejo WSSV son muy similares en el cuadro clínico, morfología al MET, histopatología e histotropismo. Los miembros de este complejo se replican en núcleos de las células derivadas del ectodermo y mesodermo.

En el Hemisferio Oriental ocasionó efectos devastadores en 1992, reconociéndose como la enfermedad más severa en camarones cultivados. Las especies afectadas fueron *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Fe. indicus* Milne Edwards, *Fe. penicillatus* Alcocky *Marsupenaeus japonicus*, que constituyen las principales especies infectadas naturalmente con el virus en los países

asiáticos. Algunos ejemplares mostraron manchas blancas en la superficie interna del exoesqueleto y la mortalidad acumulativa alcanzó al 100 % después de la aparición de los signos clínicos. (Chen, 1995, Kasornchandra y Boonyaratpalin, 1998).

Las primeras observaciones de esta nueva entidad viral fueron realizadas en granjas camaronícolas de Japón, donde la mortalidad en los cultivos de *Ma. japonicus* alcanzó más del 80 %. (0.01-22.5 g). Los camarones moribundos desarrollaron un color anormal rojizo, además de manchas blancas en el cuerpo (Nakano y cols., 1994; Takahashi y cols., 1994). Inouye y cols. (1994) identificaron al agente causal como virus, no ocluidos, en forma de varilla, con envoltura, localizado en los núcleos de las células del epitelio cuticular del estómago y células linfoidales de los ejemplares *Ma japonicus* moribundos. A esta nueva entidad le llama RV-PJ (rod shaped nuclear virus of *P. japonicus*), ubicándolo en Baculoviridae o Poly DNAviridae, tentativamente.

En 1994, sucedió otro brote de enfermedad causando serias mortalidades en el camarón tigre *P. monodon*, cultivado en Tailandia. Los signos en los ejemplares enfermos fueron una decoloración rosa o rojiza del cuerpo, con manchas en el interior del exoesqueleto en el cefalotorax. Las observaciones al MET mostraron viriones cilíndricos a elipsoidales (Asian Shrimp Culture Council 1994). Wongteerasupaya y cols., (1995) la denominaron informalmente SEMBV por el origen de los tejidos infectados, perteneciente al género NOB. Las características patológicas de este fueron la necrosis en tejidos derivados de ecto y mesodermo, pero sin la formación de los cuerpos de inclusión Cowdry tipo A.

Inouye y cols. (1994) describieron mortalidades en masa del camarón "kuruma" *Ma. japonicus*. El agente etiológico lo describieron como viriones de

forma oval, con una nucleocápside cilíndrica parcialmente lenticular, de 86 x 363nm dentro de una envoltura. Con esta base, recomendaron que este sea ordenado dentro de los Baculoviridae, subfamilia Nudivaculovirinae. Redesignaron al virus como PRDV (Penaeid rod-shaped DNA virus, anteriormente RV-PJ) y sugirieron denominar a la enfermedad PAV (viremia aguda de los peneidos).

Takahashi y cols. (1996) consideraron que el RV-PJ fue importada por Japón de una población de *Ma japonicus* de China. Desarrollaron un estudio para purificar y amplificar un fragmento del DNA del RV-PJ y aplicar la técnica de PCR para el diagnóstico no solo de RV-PJ en *Ma japonicus*, sino también para el SEMBV de *P monodon*, debido a que estas enfermedades presentan signos clínicos similares causados por un virus baciliforme, no ocluidos, ocasionando serias pérdidas económicas en los cultivos asiáticos. Purificaron partículas virales a partir de tejidos infectados con RV-PJ y por separado, con SEMBV. Concluyen que RV-PJ y SEMBV están estrechamente relacionados, en base a estudios de clonación y secuenciación, además de que causan el mismo cuadro clínico, compartiendo órganos blanco e histopatología, excepto por la formación de cuerpos de inclusión.

Park y Lee (1996), estudiaron una enfermedad masiva ocurrida en *Fe. orientalis* Kishinouye cultivados en Corea. Las características patológicas de esta enfermedad, en infecciones naturales y experimentales, fueron la decoloración rojiza del cuerpo y manchas blancas en el interior del caparazón. Histopatológicamente observaron necrosis masiva del órgano linfoide, degeneración y necrosis del epitelio epidémico e intestino anterior, con los cuerpos de inclusión amfófilicos a basofílicos en epitelio y branquias. Al MET se observaron partículas virales con envoltura, no ocluidas, en forma elipsoidal o de varilla en el interior de los núcleos de células linfoidales e intersticiales del hepatopáncreas.

Consideraron que el agente etiológico estudiado en casos de Corea fue similar a los baculovirus asociados con el síndrome de la mancha blanca (WSBV) ocurridos en Taiwan.

El histotropismo de la infección por WSBV hospederos silvestres, *P. monodon*, fue analizado por Lo y cols. (1997) en 16 partes disectadas: pleopodos, branquias, estómago, músculo abdominal, hemolinfa, intestino medio, corazón, pereopodos, órgano linfoide, integumanto, tejido nervioso, hepatopáncreas, testículos, ovario, espermátóforos y tallo ocular. En todos los tejidos y órganos estudiados observaron replicación viral. Por primera vez, los estudios de hibridación *in situ* y MET mostraron evidencias del WSBV en órganos reproductores. Sin embargo, no observaron huevos maduros infectados, considerando que estos fueron matados por el virus antes de la maduración.

En 1998 se reportó un brote epizootico viral en cultivos de *Fe chinensis* de Corea. El agente causal se identificó como un virus similar al WSSV de Taiwan, con base en los signos clínicos (coloración rojiza y manchas blancas) y a la morfología viral al MET. Consideraron que este difirió morfológicamente al RV-PJ estudiado en Japón. Sin embargo, encuentran un producto de PCR de 643 pb con una secuencia idéntica a la de RV-PJ. Concluyeron que el agente coreano combinó características de WSSV y RV-PJ (Takahashi y cols., 1996)

Uno de los principales portadores silvestres, de los cuales se pensaba que no desarrollaban la enfermedad, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, fue estudiado por Peng y cols. (1998), quienes observaron las manchas blancas en el exoesqueleto, seleccionando ejemplares infectados en forma natural. Por PCR, los productos amplificados fueron similares a los de *P. monodon* y la comparación de

los perfiles de restricción con *Hae* III, *Hpa* II, *Rsa* I y *Sau* 3 A1 no revelaron diferencias. Un homogeneizado de los tejidos infectados de *P. monodon* fue inoculado a larvas y PL's de *M. rosenbergii* sanos. Después de dos días, algunos de los especímenes muertos fueron positivos para WSBV.

Otros hospederos silvestres estudiados, pero negativos a la infección por WSSV fueron *Exopalemon orientalis*, *Trachypenaeus curvirostris*, *M. ensis* De Haan, *Macrobrachium* sp y *Procambarus clarkii*. Las jaibas *Calappa lophos*, *Portunus sanguinolentus* (Herbst) , *Charybdis granulata* Lamark *C. feriata* tampoco presentaron infección natural, al igual que las langostas *Panulirus ornatus* Heller, *P. versicolor* Latreille, *P. longipes* (Milne Edwards) y *P. penicillatus* Olivier, colectadas de las costas de Taiwan. Los casos de WSSV positivos fueron detectados en las cuatro especies mayores de cultivo, *P. monodon*, *Ma japonicus*, *Fe penicillatus* y *Metapenaeus ensis* (Wang y cols., 1998), aunque en el laboratorio se demostró la capacidad de las jaibas *Scylla serrata* Forskål, 1775 , *Sesarma* y *Uca pugilator* como portadoras del WSSV. Kanchanaphum y cols. (1998) infectaron experimentalmente a estos hospederos manteniendo la infección viral hasta por 45 días sin que desarrollaran un cuadro clínico de la enfermedad. Todas ellas transfirieron la enfermedad vía agua a *P. monodon*. Estos estudios demostraron que las jaibas son un problema real en los sistemas de cultivo. Otros reservorios potenciales que han sido identificados mediante estudios experimentales son la jaiba de la arena *Portunus pelagicus* Linné, *Scylla serrata* y el krill *Acetes* sp., los cuales son capaces de transportar el agente infeccioso y persistir por largos periodos en el medio ambiente de las granjas camaronícolas (Supamattaya y cols., 1998).

En vista de la diversidad de aislados que se reportan de WSSV, Kasornchandra y cols. (1998) analizaron aislados virales de epizootias ocurridas en seis diferentes países por histología, MET y PCR. Para aplicar la última técnica,

diseñaron los iniciadores 102 F1 y 102 R1. Los cambios histopatológicos en su totalidad fueron similares, caracterizados por degeneración celular, hipertrofia nuclear y marginación de la cromatina en los tejidos de origen ecto y mesodérmico, con la presencia de cuerpos de inclusión Cowdry, tipo A. Al MET observa similitud en tamaño y morfometría de los seis diferentes aislados. Por PCR, obtuvieron un producto amplificado de 520 pb en los aislados de Indonesia, Tailandia y Malasia, pero con los aislados de Japón, China e India se presentaron productos de peso molecular mayor a lo esperado.

Una de las principales contribuciones sobre la epizootiología de WSSV es la de Sudha y cols. (1998), quienes distinguieron tres tipos diferentes de epizootias en la India, asociadas al WSSV en los cultivos de camarón *P. monodon* y *Fe indicus*. En el Tipo I (aguda o subaguda), el nivel de severidad de infección en los tejidos fue moderada a alta, las mortalidades más significativas ocurrieron dentro de los 7-10 días. Los camarones afectados presentaron prominentes manchas blancas en el caparazón como el principal signo clínico. En el Tipo II (preagudo), los camarones afectados mostraron una masiva coloración rojiza, el nivel de severidad a los tejidos fue muy alta y las mortalidades en masa ocurrieron a los 2-3 días. El Tipo III (crónico) presentó baja severidad a los tejidos, con las manchas blancas o coloración rojiza ausente. Las mortalidades se presentaron entre los 15 a 28 días, pero escasas. La forma preaguda fue más común en los juveniles, mientras que la forma aguda a sub aguda y crónica fueron más comunes en los sub adultos y adultos. Las formas agudas y subagudas se observaron en el 60 % de las epizootias., mientras que la forma crónica y preaguda en el 30 y 10 % de los brotes, respectivamente.



**c) Presencia del complejo WSSV en el Continente Americano:** Los primeros casos diagnosticados de WSSV en el Hemisferio Occidental, ocurrieron casi simultáneamente en octubre y diciembre de 1995 en granjas de *L. setiferus* (Linnaeus) cultivados en Texas y Carolina del Sur, EUA (Lightner, 1996; Nunan y Lightner, 1997). Este fue diagnosticado por histopatología y confirmado por hibridación y PCR. El tercer caso de WSSV fue registrado en langostinos *Procambarus clarkii*, *Orconectes punctimanus* y *Procambarus* spp. del Zoológico Nacional en Washington, DC. (Lightner y cols., 1997), en diciembre del mismo año.

Debido al enorme impacto económico causado a la industria camaronícola asiática, en el periodo de 1992 a 1998, y a los focos epizooticos ocurridos en los Estados Unidos de América, se realizaron inoculaciones experimentales con las cepas asiáticas del WSSV en penaeidos americanos con el objeto de conocer el efecto patológico o bien, la susceptibilidad de estos hospederos a la infección. Durand y cols. (1996) aislaron el agente de la enfermedad referida como WSS y WSBV, infectando experimentalmente a *L. vannamei* y *L. stylirostris* con un homogeneizado de *P. monodon* infectado proveniente de Tailandia. Al MET, los viriones midieron 350 nm de longitud y 130 de ancho. Las nucleocápsides oscilaron de 300 a 420 nm de longitud y 70-95 de anchura con una superficie segmentada. Describieron también la presencia de partículas únicas que no habían sido observadas anteriormente y fueron las nucleocápsides más usuales (400 x 120 nm).

La presencia del virus asiático, WSSV, en Texas, EUA, planteó una seria pregunta, ¿Cómo entró el virus al Hemisferio Occidental? La diseminación de virus exóticos históricamente se atribuyó a la introducción de animales enfermos, como sementales, en áreas libres de infección; aves que actúan como vectores y transportan al agente infectivo; así como la importación y procesamiento de

productos alimenticios congelados. El último mecanismo se consideró de mayor importancia, debido a los elevados volúmenes de alimento congelado, que son importados por los EUA. Este país, en 1995 importó 118, 888, 869 kg de camarón provenientes de seis exportadores asiáticos: China, India, Tailandia, Vietnam, Indonesia y Filipinas. De este volumen, el producto congelado, constituyó el 97 % de todo el camarón importado (United States Department of Commerce, 1997). El producto recibido, por lo común fue re-empaquetado y procesado en las plantas situadas en las costas. Los desechos sólidos y líquidos de estas plantas fueron desechados al mar sin un tratamiento previo. De acuerdo a los análisis efectuados por Nunan y cols. (1998), los ensayos de infectividad, MET y PCR, han demostrado que los virus WSSV y YHV fueron detectables e infecciosos en las importaciones de producto congelado.

El estudio de otras especies de penaeidos americanos como hospederos experimentales de WSSV y YHV fue realizado por Lightner y cols. (1998). En este, las PL's y juveniles de *Fa aztecus*, *Fa duorarum*, *L. setiferus* y *L. vannamei* fueron inoculadas con tejidos infectados por los virus, provenientes de Asia. Los retos en las PL's de *L. setiferus* y *L. vannamei*, resultaron en infecciones severas, mientras que en *Fa aztecus* y *Fa duorarum* fueron menos severas. En los juveniles de *L. setiferus* y *L. vannamei*, el WSSV causó mortalidad acumulativa del 100 %. En *Fa aztecus*, se determinó una infección moderada, con mortalidad acumulativa del 27 %. En contraparte, *Fa duorarum* no presentó signos de infección y la mortalidad acumulativa fue del 0 %. El YHV, en cambio, causó mortalidad severa y mortalidad en los juveniles de las cuatro especies, pero las PL's fueron resistentes a la infección, sin presentar signos típicos de enfermedad,

La virulencia de seis aislados geográficos de WSSV en las PL's de *L. vannamei* y juveniles de *Fa duorarum* fue comparada por Wang y cols. (1999), quienes reconocieron al WSSV como uno de los patógenos más importantes de camarón, extendiéndose en la mayoría de los países asiáticos donde se cultiva el crustáceo, así como en el Golfo de México y el SE de los EUA. Comparan Los aislados originarios de China, India, Tailandia, Texas, Carolina del Sur y el aislado de cangrejos cautivos del Zoológico Nacional de los EUA. En el estudio, los hospederos experimentales fueron inoculados *per os* con tejidos infectados. Las infecciones resultantes fueron confirmadas por histología. La mortalidad acumulativa en *L. vannamei* alcanzó el 100 % después del reto con cada una de los seis aislados geográficos de WSSV, en el cual, el aislado de Texas, sin embargo, causó mortalidad más rápida que los otros aislados. En un marcado contraste, la mortalidad acumulativa en *Fa duorarum* alcanzó del 35 al 60% con los diferentes aislados. En este, el aislado de Texas fue también el más virulento. En conclusión, la virulencia varió entre cada aislado geográfico de WSSV y la susceptibilidad varió también con la especie y estadio de los hospederos.

Ultimamente, en el periodo de febrero a marzo de 1999, se registraron los últimos casos de epizootias en Nicaragua, Guatemala y Honduras. Los primeros reportes se originaron en Honduras, a mediados de enero, observándose a los camarones con estrés y un cuadro parecido al síndrome de Taura. Lo inusual de este signo fue que los cultivos de *L. stylirostris* fueron los mas afectados. Cabe señalar que el origen de las larvas fue el silvestre. Por su parte, la semilla de laboratorio, *L. vannamei* fue afectada en un grado mucho menor. Este reporte, constituyó el primer registro del WSSV en las costas del Pacífico del Continente Americano, pues los registros anteriores estaban limitados a los organismos silvestres y cultivados del Golfo de México (Deli Group-Ecuador and Aquaculture

Fonseca-Honduras, 1999; Carlos Lara G., Cosechas Marinas, Costa Rica, com. pers.).

**d) Caracterización molecular del complejo WSSV:** El genoma viral fue identificado como DNA no segmentado de doble cadena, aproximadamente de 163 kpb. Takahashi y cols. (1996) Extrajeron el DNA genómico y efectuaron digestiones con *Eco* RI/*Hind* III. Insertaron los fragmentos en el sitio *Eco* RI/*Hind* III del plásmido pGEM 3zf (+) y con los plásmidos recombinantes transformaron *Escherichia coli* XL1-BlueMRF'. Emplearon la clona Pjb79, con un inserto de 889 pb para diseñar un par de iniciadores. De acuerdo a la secuenciación realizada y a las reacciones de prueba, el producto amplificado mide 643 pb. Los iniciadores diseñados fueron probados con tejido del órgano linfoide infectado con RV-PJ y SEMBV, los cuales sirvieron como templado, concluyeron que ambos están estrechamente relacionados.

Un integrante más del complejo, denominado baculovirus asociado al síndrome de la mancha blanca fue aislada del camarón tigre *P. monodon*. Esta cepa se utilizó para desarrollar una herramienta diagnóstica por Lo y cols. (1996) para la detección del WSBV y otros agentes infecciosos relacionados. Purificaron los viriones y extrajeron el DNA para la construcción de bibliotecas genómicas. Diseñaron dos pares de iniciadores específicos, con los cuales amplifican productos de 1447 pb y un segundo producto de 941 pb. Consideraron que este estudio constituye una buena herramienta para estudios comparativos de otros baculovirus no ocluidos, tales como el RV-PJ de Japón; HHNBV de China; SEMBV de Tailandia y WSBV de Taiwan, así como otros baculovirus no ocluidos. Estos investigadores emplearon iniciadores específicos para amplificar en DNA genómico del camarón para monitorear la contaminación del DNA de camarón en las preparaciones de

DNA genómicas de WSBV. Con este objetivo diseñan un par de iniciadores a partir de una región altamente conservada de la secuencia 18 s RNA de los decápodos, basada en las secuencias publicadas por Kim & Abele (1990). Con estos iniciadores, se espera un producto de PCR de 848 pb, correspondiente a las secuencias 352 – 1200 de la subunidad 18 S rRNA de *Fa. aztecus* Ives. Durand y cols. (1996) después de la extracción de los ácidos nucleicos obtuvieron fragmentos de digestión con la enzima *Eco* RI para efectuar la clonación de una parte del genoma. Caracterizaron cuatro de estos fragmentos y los utilizaron como sondas no radioactivas, etiquetándolas con DIG. Las sondas así preparadas, hibridaron con el material localizado en los núcleos de los tejidos infectados, como son el tejido conectivo, tejido epitelial, músculo y tejido nervioso, incluyendo también, los hemocitos.

Una herramienta diagnóstica, basada en la producción de sondas por la tecnología dl PCR, fue desarrollada por Nunan y Lightner (1997). Utilizaron la información de secuencias de dos baculovirus de camarón, BP y MBV, para crear iniciadores que produjeron una banda de 750 pb al ser probados con WSSV de *P. monodon* como templado.

# METODOLOGIA

## I. MATERIAL BIOLÓGICO:

La colección de muestras se dividió en dos etapas, de acuerdo a los brotes epizooticos o signos indicativos detectados en el periodo de muestreo. Las características patológicas de los ejemplares consideradas, para ser seleccionados en el estudio, fueron la expansión de los cromatóforos rojos (camarón rojo o rosado) en todo el cuerpo o en apéndices caudales, periopodos y pleopodos. Aunado a esto, se consideró el desarrollo de manchas blancas en el exoesqueleto o bien, la presencia de necrosis cuticular extensiva asociado o no a brotes de mortandad en masa.

### 1) ORIGEN DE LAS MUESTRAS

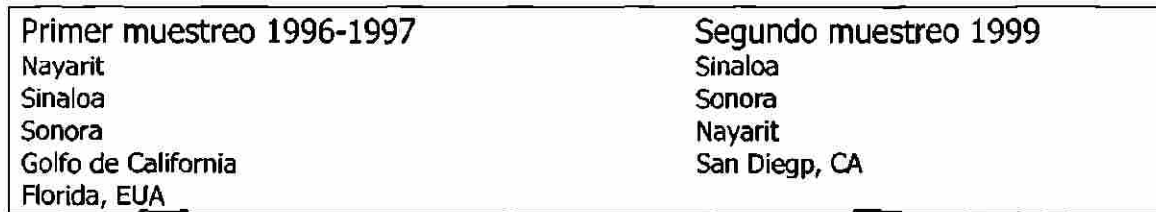
**A.- Primer muestreo (1996-1997):** Las muestras infectadas fueron colectadas en epizootias de granjas camaronícolas de los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, durante el periodo de Junio de 1996 a Octubre de 1997. La patología, sugestiva de una etiología viral fue detectada en secciones de cefalotorax, teñidas con hematoxilina y eosina. El criterio patológico que se consideró es el descrito por Brock y cols. (1995); Lightner y cols. (1995) y Hasson y cols. (1996). Los sitios de muestreo y especie de los organismos estudiados se citan a continuación (Tabla 3; Fig. 1).

Las muestras fueron transportadas del lugar de colecta en CO<sub>2</sub> sólido, al Centro Nacional de Sanidad Acuicola (CNSA) de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL donde se conservaron a -70 °C. Las muestras de Miami Florida y del Golfo de California se emplearon como controles negativos durante el proceso de purificación de partículas y electroforesis en agarosa y acrilamida para diversos propósitos (ver diagrama de flujo de la metodología a continuación).



## B.- Diagrama de flujo de la metodología utilizada

### Muestreos



Caracterización del TSV y la Enfermedad que causa.

- a) Purificación del virus por gradientes de densidad
- b) Microscopía electrónica de las partículas virales.
- c) Bioensayos

d) Análisis histológico de la infección.

Caracterización del WSSV y sus enfermedades.

- a) Signos macroscópicos.
- b) Histopatología de la infección.
- c) Identificación del WSSV por PCR

d) Desarrollo del sistema de PCR multiplex.

e) Hibridación de ácidos nucleicos en membrana e in situ.

f) Identificación de proteínas virales por SDS-PAGE

g) Caracterización de ácidos nucleicos virales.

h) Extracción de AN totales y análisis de PCR para WSSV.

**C.- Segundo muestreo:** La segunda serie de muestras analizadas, fueron los brotes epizooticos ocurridos durante los meses de Febrero a Julio de 1999 en los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit. Los signos clínicos macroscópicos correspondían también a la expansión de cromatóforos extendiéndose en todo el cuerpo y apéndices, similar a la anterior etapa. La especie afectada principalmente fue también *L. vannamei*. Las postlarvas y los adultos jóvenes, durante la etapa de muda fueron así mismo, los más afectados. La diferencia en los casos clínicos fue, en primer lugar, que no todos los camarones sobrevivientes desarrollaron la necrosis cuticular extensiva, sino, manchas blancas, circulares, de 0.2 a 3 mm (estas últimas muy escasas) aproximadamente, difíciles de detectar a simple vista. La diferencia, con los brotes registrados en nuestro país, fue la escasa mortalidad observada en los estanques que fueron afectados. Las localidades estudiadas corresponden a los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, los cuales aparecen en la Tabla 4 y Figuras 2-3.

Tabla 3. Sitios de muestreo y especies de camarón analizados. Junio 1996-Octubre 1997.

ORIGEN	GRANJA	ESPECIE
<b>Nayarit</b>	Santos López, San Blas	<i>L. vannamei</i>
	Los Espejos/Matatipac, San Blas	<i>L. vannamei</i>
<b>Sinaloa</b>	Ramón Ahumada, Los Mochis	<i>L. vannamei</i>
	Finca Camaronera de Guasave	<i>L. vannamei/L. stylirostris</i>
	El Dorado, Guasave	<i>L. vannamei</i>
<b>Sonora</b>	Maritech, San Luis Río Colorado	<i>L. vannamei</i>
<b>Golfo de California</b>	Silvestre	<i>L. vannamei</i>
<b>Florida, EUA</b>	GMSB Inc., Summerland	<i>L. vannamei</i>

**D.- Transporte de las muestras al laboratorio:** En esta fase de trabajo, los especímenes seleccionados se trasladaron en su mayoría vivos, con oxígeno suplementario, en bolsas de polietileno selladas. El resto de las muestras se preservaron en etanol 96 %, inyectándose en cefalotorax y cada uno de los segmentos antes de depositarse en envases de plástico con etanol 96 %.

Tabla 4. Sitios de muestreo y especies de camarón analizados. Febrero-Julio de 1999.

ORIGEN	GRANJA	ESPECIE	
<b>Sinaloa</b>	Granja el Thenari	<i>L. vannamei</i> Jaiba silvestre ( <i>Callinectes</i> sp)	
	Granja Shrimp Quality	<i>L. vannamei</i>	
	Granja Acuavisión,	<i>L. vannamei</i>	
	Granja El Baturi	<i>L. vannamei</i>	
	Acuícola Valdés	<i>L. vannamei</i>	
	Explotación Acuícola	<i>L. vannamei</i>	
	Juventud Pesquera	<i>L. vannamei</i>	
	Granja Coguasín	<i>L. vannamei</i>	
	S.C. y P, A. Mayocoba	<i>L. vannamei</i>	
	Manuel Avila Camacho	<i>L. s vannamei</i>	
	Acuícola Baja Mar	<i>L. vannamei</i>	
	Las Isabeles	<i>L. vannamei</i>	
	<b>Sonora</b>	Ejido Francisca Felix.	<i>L. stylirostris</i>
		Jorge Díaz Serrano	<i>L. stylirostris</i>
Héroes del Campo #2		<i>L. stylirostris</i>	
Comuneros Mayos		<i>L. stylirostris</i>	
<b>Nayarit</b>	Estero Quiropo	<i>L. stylirostris</i> (silvestre)	
	Bahía de Matanchen, Nayarit	<i>L. vannamei</i> (silvestre)	
<b>San Diego, CA</b>	Aquadiagnostics	Control positivo	

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



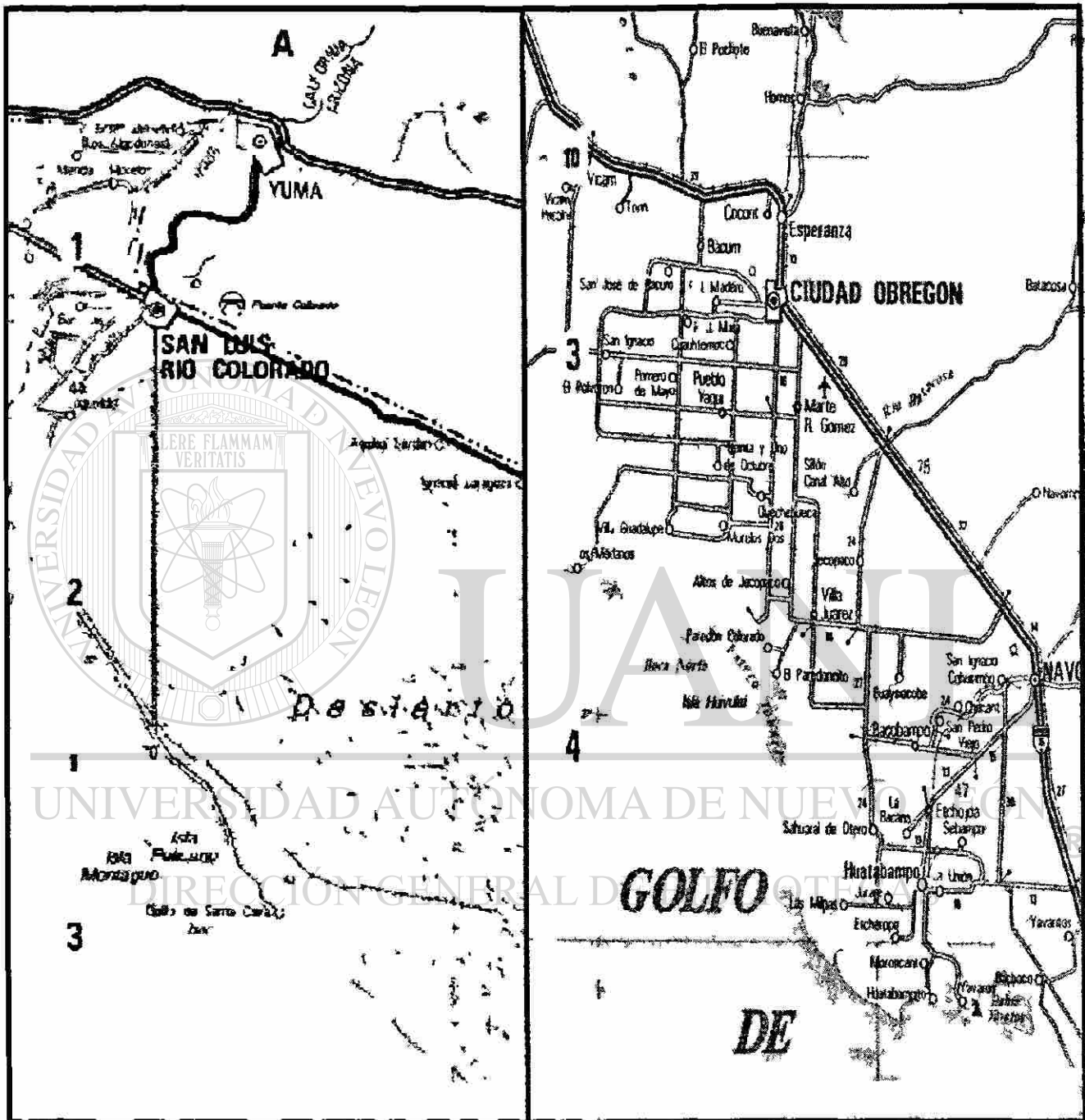


Fig. 1. Sitios de muestreo correspondientes a Sonora. (A) Mapa 1: Golfo de Santa Clara, San Luis Río Colorado; y (B) Mapa 2: Estero Siari/Atanasia, Cd, Obregón.

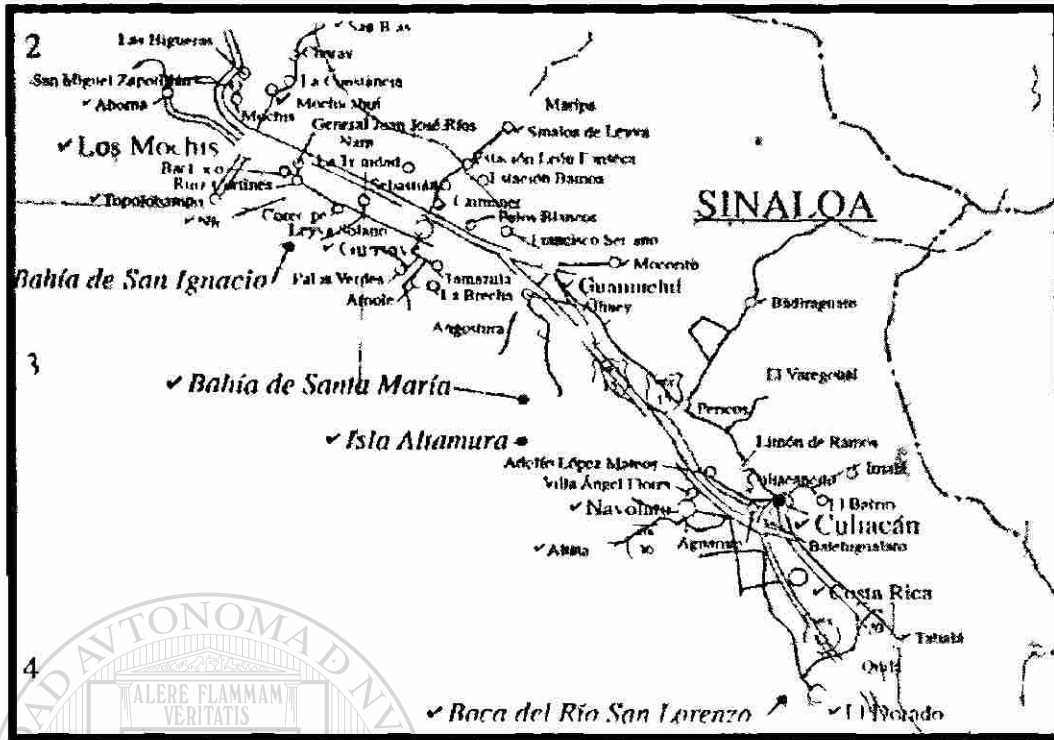


Fig. 2. Localidades de muestreo de *L. vannamei* y *L. stylirostris*, cultivados en Los Mochis y Guasave, Sinaloa.

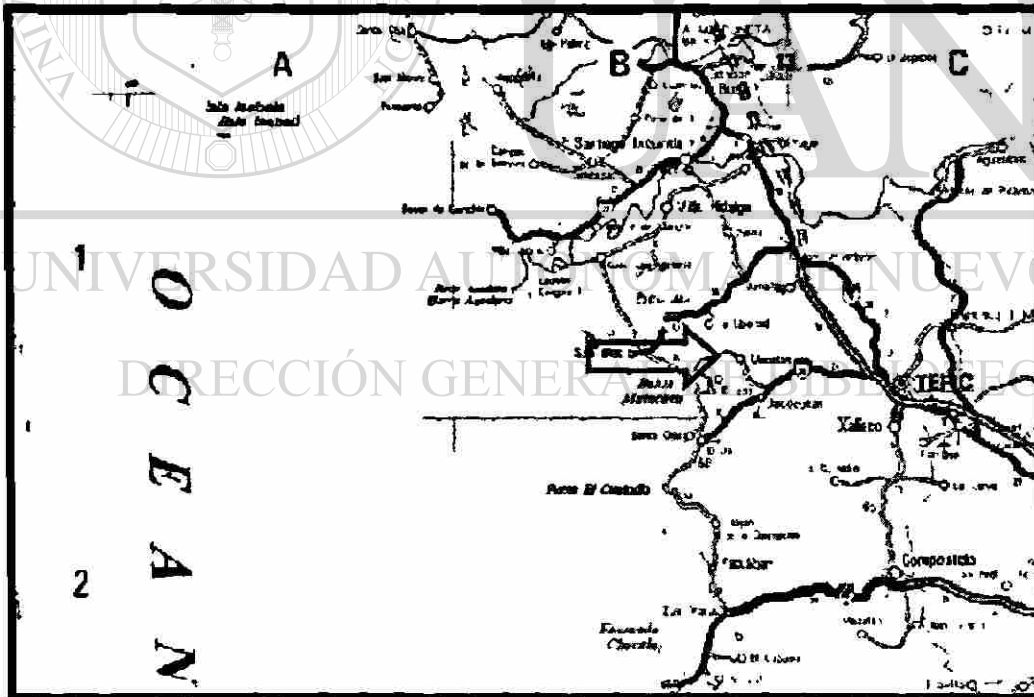


Fig. 3. Localidad estudiada correspondiente a Ensenada de Los Cocos, Matanchen, San Blas, Nayarit (flecha).

## II. PURIFICACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO.

### 1.- Procedimientos de ultracentrifugación.

**A.- Centrifugación diferencial:** Se utilizó la técnica descrita por Trudel y Payment en 1993. Para cada uno de los procedimientos se emplearon de 20 a 30 ejemplares conservados a -70 °C. Se eliminó la exocutícula del cefalotorax o gnatotorax, para homogeneizar los tejidos en una licuadora de cocina (Osterizer®) con 400-500 ml de solución amortiguadora TN (Tris-HCl 20 mM y NaCl 0.4 M, pH 7.4-7.6) frío, en intervalos cortos de tiempo intercalándolos con enfriamiento periódico. Este homogeneizado fue centrifugado en tubos tipo oakridge opacos de polipropileno (Nalgene®) a 2,000 rpm por 10 min. Después los sobrenadantes fueron centrifugados a 5,000 rpm por 10 min recuperando también los sobrenadantes en nuevos tubos para repetir el paso de centrifugación a 16,000 rpm por 30 min. Las modificaciones realizadas al procedimiento son las que recomienda Bonami y cols. (1991). En cada una de las corridas que se describen, los sobrenadantes se recuperaron en tubos limpios y estériles, mientras que los precipitados fueron re homogeneizados y centrifugados de nuevo a la misma velocidad (antes de descartarlos) junto con la capa de grasa de la parte superior del tubo, reuniendo los sobrenadantes con los iniciales; los tubos se enjuagaron con 3-5 ml de solución amortiguadora TN y este se reunió con el material a re homogeneizar. Todas las corridas se efectuaron a 4 °C.

Los sobrenadantes provenientes de la clarificación a 16,000 rpm fueron concentrados en una ultracentrífuga a 150,000 *g* por 2.5 h a 4°C, recuperando los precipitados y resuspendiéndolos en 500 µl de TN; posteriormente el precipitado se dispersó en un ultrasonificador por 5 min o en jeringas de 1 ml.

**B.- Extracción con freon:** De acuerdo con las recomendaciones de Bonami (1996, com. pers.) el precipitado se homogeneizó con 1 vol. de freon (1,2,2-tricloro-



1,2,2-trifluoroetano, Sigma <sup>MR</sup>), agitando por 10 min y centrifugando a 2,500/10 min para desechar el freon. A la suspensión se le agregó 0.1 g de carbón activado (Sigma <sup>MR</sup>) agitándose por 5 min para filtrar posteriormente en una capa de Celite-235 enjuagándose en TN. El material extraído fue precipitado de nuevo a 150,000 g y resuspendido en 300-1000 ml de TN. (Bonami y cols., 1990).

### **C.- Centrifugación en gradientes de densidad discontinuos y lineales:**

Se preparó un gradiente discontinuo de sacarosa (15-40%) con jeringas de 10 ml y aguja 18 en tubos ultraclear (Sigma <sup>MR</sup>) depositando 700-850 ml de la suspensión sobre el gradiente. Las corridas se efectuaron en el rotor horizontal SW 28 (Beckman 50<sup>MR</sup>) por 3 h a 27,000 rpm a 4°C (Bonami y col 1991). Los gradientes continuos o lineales se prepararon de forma similar, dejándolos reposar toda la noche a 4 °C. La recuperación de las bandas se realizó con agujas estériles del N° 18, enjuagándolas en 500 ml de TN y precipitándolas de nuevo a 150,000 g para efectuar bioensayos (ver más adelante), (Hasson y cols., 1995). o preparaciones con tinción negativa al MET para la identificación de partículas virales (Payment y Trudel, 1993).

---

**D.- Densidad del virus en gradiente de CsCl:** Una vez realizadas las observaciones al MET y efectuados los bioensayos, se continuó con los gradientes lineales en CsCl para conocer la densidad flotante ( $\rho$  en centrifugación isopícnica). El gradiente en CsCl se realizó manualmente en concentraciones (peso/peso) del 50 al 20 % diluido en solución amortiguadora TE 0.1 X (Tris-HCl 10 mM y ácido etilen diamino tetracético, EDTA, 1 mM, pH 7.4) depositándose 500 ml de la suspensión viral sobre el gradiente. La centrifugación se efectuó en un rotor horizontal SW 41 (Beckman 50<sup>MR</sup>) a 28-35,000 rpm por 12 h a 4 °C. Al final de la corrida se colectaron fracciones de 500  $\mu$ l en microtubos (Eppendorf <sup>MR</sup>). A cada fracción se le determinó la absorvancia en un Espectrofotómetro Beckman<sup>MR</sup> 750 a una densidad óptica de 340 nm ( $A_{340}$ ) para detectar las fracciones con proteínas en la muestra.

Posteriormente se determinó el índice de refracción de las fracciones en un refractómetro de Abbé marca Bausch-Lomb<sup>MR</sup> para conocer la densidad de la fracción perteneciente al virus, graficándose las fracciones VS absorbancia y fracciones VS densidad para calcular la densidad de cada fracción. Las fracciones con lecturas mayores fueron precipitadas a 40,000 rpm por 3 h y se confirmó al MET y bioensayos la existencia del virus en la fracción.

**E.- Tinción negativa para microscopía electrónica:** La metodología empleada para la observación de partículas virales en el MET, fue como sigue, una gota (10  $\mu$ l) de la suspensión de muestra procedente del proceso de purificación, se depositó en Parafilm<sup>®</sup> y sobre esta se colocó una rejilla de 200 mallas (tratada previamente con collodion/carbón) permaneciendo en contacto por 2 min. Después se eliminó el exceso de líquido absorbiéndolo con papel filtro Watman. El material depositado en la rejilla fue teñido con ácido fosfotúngstico 2 % en agua bidestilada por 30 seg eliminando el exceso con papel filtro y dejándolo secar. En ocasiones se utilizó acetato de uranilo filtrado en nitrocelulosa con poros de 22 nm (Alain y Berthiaume, 1993).

### III. ENSAYOS DE BIOINFECTIVIDAD

Las bandas seleccionadas de los gradientes de sacarosa y CsCl, fueron probadas para determinar la infectividad de las partículas virales purificadas. Con este propósito, el agua previamente dechlorada se utilizó para disolver sal marina Ocean Instant<sup>®</sup>. Esta se estabilizó por 24 h, tal como lo recomienda el fabricante, antes de introducir los camarones. Los acuarios fueron desinfectados previamente en hipoclorito de calcio 1 %, enjuagándolos con abundante agua después de 15 min de contacto. Los bioensayos se realizaron con 15 camarones *L. vannamei*, de 1.5 a 2 g de peso. El inóculo consistió de 20  $\mu$ l de la suspensión viral purificada y semipurificada (diluida 1:10 en agua inyectable) aplicándose por vía intramuscular en

el músculo caudal con una jeringa de 1 ml. El seguimiento se realizó durante 15 días, determinando la mortandad diaria (días de post infección dpi) por acuario y las principales características físico químicas del agua como son pH, salinidad y temperatura. Los acuarios se mantuvieron separados físicamente y además, se cubrieron con polietileno o vidrio para evitar la posible contaminación por salpique de agua entre los acuarios. El alimento proporcionado a los camarones fue Ranger 0-4, esterilizándolo con anterioridad a 120 lb/15 min como una medida preventiva. Cada grupo control se mantuvo en un área separada, bajo las mismas condiciones que los anteriores, sólo que a estos no se les inoculó. Los ejemplares con los signos agudos de la enfermedad fueron procesados para MET, ML y otros procesados por ultracentrifugación, estos para determinar la presencia del agente causal.

#### **IV. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE (SDS-PAGE)**

Para determinar el peso molecular de las proteínas que constituyen la cápside de los viriones, se prepararon geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio constituidos de un gel concentrador al 6 % y un separador al 12% de acrilamida (Laemmli, 1970). El corrimiento fue llevado a cabo usando una solución reguladora de fosfatos con SDS al 0.1 % y corriente constante de 35 mA, 200 volts recomendados para la cámara vertical Mini-V 8:10 (Gibco, Life Technologies<sup>MR</sup>). Las proteínas virales se diluyeron a razón de 1:2 con solución amortiguadora de muestra 2X, desnaturalizándose a 100 °C por 5 min. Los marcadores de peso molecular empleados fueron: Fosforilasa B; ovoalbumina, e inhibidor de tripsina, utilizados para la comparación del peso molecular de las proteínas virales. Los geles fueron teñidos con azul Coomassie (1.25 g disuelto en 500 ml en una solución metanol-ácido acético) y otra serie de geles fue teñida con plata, según el protocolo descrito por Caetano-Anollés y Gresshoff (1994). Posteriormente los geles se colocados en papel celofán y fueron deshidratados en placas de vidrio por 24 hrs para su preservación

permanente. La molaridad de los polipéptidos fue medida de acuerdo a su desplazamiento electroforético (Weber y Osborn; 1969).

## V.- EXTRACCIÓN DEL GENOMA VIRAL

Una vez establecida la presencia del virus en las fracciones correspondientes, estas se precipitaron a 150,000 g en la ultracentrífuga Beckman, resuspendiéndolas en 400  $\mu$ l de solución amortiguadora TE en microtubos (Eppendorf<sup>®</sup>). La desnaturalización de las proteínas y liberación del genoma se inició adicionando 50  $\mu$ g/ml (concentración final) de proteinasa K en presencia de SDS 1% (Gibco BRL<sup>®</sup>) a 37 °C/0.5 h (Campbell y Gerard, 1994). Inicialmente se realizaron extracciones de ácidos nucleicos totales con fenol equilibrado precipitándose con etanol (Sambrock y cols, 1989), pero debido a los resultados poco efectivos, se procedió a realizar las extracciones subsecuentes con Trizol<sup>®</sup> (Gibco, BRL), agregándose 1 ml de Trizol<sup>®</sup> homogeneizando por inversión e incubándose 5 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se mezclaron vigorosamente, centrifugándose a 12,000 g/15 min./4°C. La fase superior acuosa que contiene el RNA se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó con 0.5 ml de isopropanol/15 min a 12,000 rpm /10 min. La pastilla se lavó con etanol 75 % y se disolvió en agua DEPC (Simms y cols., 1993). El corrimiento electroforético se efectuó en geles de agarosa estándar al 1% con 0.5  $\mu$ l de bromuro de etidio en solución amortiguadora de TAE (Tris acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M) (Voytas, 1993). Cada 4  $\mu$ l de muestra fueron diluidos con 4  $\mu$ l de agua y desnaturalizada con 1  $\mu$ l de SDS 20 % y calor (70 °C por 5 min), adicionándose 1 ml de solución amortiguadora muestra antes de depositarse en los posos del gel. La electroforesis se efectuó a 70-100 mA con una fuente de poder Eppendorf. La naturaleza de los ácidos nucleicos extraídos fue confirmada con RNAasa (Ribonucleasa A, SIGMA<sup>®</sup>) a una concentración de 50  $\mu$ g/ml por 30 min a 37 °C; 0.2 unidades de Nucleasa SI (SIGMA<sup>®</sup>) a 37 °C / 5 h a 37 (DNAasa para DNA de doble cadena) o Deoxiribonucleasa I (DNAasa 1, libre de RNAasa, SIGMA<sup>®</sup>) a 0.5

$\mu\text{g}/15$  min de acuerdo a las instrucciones del fabricante y calor ( $100^{\circ}/3$  min), según Sambrook y cols. (1989).

## **VI. HIBRIDACIÓN *IN SITU* HIBRIDACIÓN EN MEMBRANAS.**

Una de las alternativas para la identificación del agente causal, fue la aplicación de sondas de hibridación del kit comercial Diagxotic<sup>®</sup>. La distribución comercial de este inició a finales de 1998, el cual se aplicó también a los cortes de tejidos para comparar los resultados de este estudio con el de otros investigadores. El procedimiento que se siguió fue el que se describe en Boheringer Mannheim (1989) y el del fabricante. La identificación se confirmó en los ejemplares con infección natural y en los ejemplares inoculados en el laboratorio mediante los bioensayos realizados.

## **VII. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

En el muestreo de Febrero-Julio de 1999 se observaron signos sugestivos de la enfermedad llamada síndrome de la mancha blanca, por lo cual se utilizó la técnica de PCR, aplicando los iniciadores descritos en la literatura asiática (Inouye y cols., 1994; Kasornchandra y cols., 1998; Kim y cols., 1998; Lo y cols., 1998; Park y cols., 1998; Peng y cols., 1998; Takahashi y cols., 1994; 1996; Wang y cols., 1995), donde esta entidad viral ha causado pérdidas importantes en la producción camaronícola. También en el Continente Americano, durante 1995, una serie de brotes epizooticos se sucedieron en Texas y South Carolina. Durante el período comprendido de Enero a Marzo del presente año, se registró una mortalidad masiva en las granjas que circundan el Golfo de Fonseca, pertenecientes a los países de Honduras y Guatemala, donde se identificó al agente causal como el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), con mortalidades de hasta el 90 % de la producción.

**A.- Extracción de ácidos nucleicos:** De cada ejemplar se tomaron 50 mg de tejido branquial (previamente congelados con hielo seco para transportarlos al CNSA) y se agregó 1 ml del reactivo DNAzol<sup>®</sup> (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y.). El tejido se homogeneizó con un macerador de pistilo, lisando la muestra por pipeteo repetitivo. Después el homogeneizado fue centrifugado a 10,000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo, precipitando el DNA con 0.5 ml de etanol absoluto. El homogeneizado se mezcló por inversión y se incubaron a temperatura ambiente por 1-3 min. La precipitación del DNA se completó por centrifugación a 4 000 x g/1-2 min a temperatura ambiente. El precipitado de DNA se lavó con etanol al 95 %, conservándolo en solución amortiguadora TE 1X hasta el momento de utilizarlo.

**B.- Selección de iniciadores para la reacción:** En la literatura existe una amplia variedad de referencias (Inouye y cols., 1994; Kasornchandra y cols., 1998; Kim y cols., 1998; Lo y cols., 1998; Park y cols., 1998; Peng y cols., 1998; Takahashi y cols., 1994; 1996; Wang y cols., 1995) donde se mencionan diferentes iniciadores para la detección del virus responsable del síndrome WSSV, las cuales varían según el aislado geográfico, hospedero o variación clínica/histopatológica que se observó en los casos epizooticos. Por esta razón, se sintetizaron los siguientes iniciadores, los cuales corresponden a agentes etiológicos que ocasionan un aspecto patológico similar en Asia (Inouye y cols., 1994; Kasornchandra y cols., 1998; Kim y cols., 1998; Lo y cols., 1998; Park y cols., 1998; Peng y cols., 1998; Takahashi y cols., 1994; 1996; Wang y cols., 1995):

---

WSBV) 1F: 5' ATC TGA TGA GAC AGC CCA AG 3'

1R: 5' GGG AAT GTT AAA TAT GTA TCG G 3' (Kim y cols., 1998)

---

WSBV)146 F1 5' ACT ACT TTC AGC CTA TCT AG 3'

146 R1 5' TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG 3'

146 F2 5' GTA ACT GCC CCT TCC ACT TCC 3'

146 R2 5' TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T 3'



146 F4	5' AGA AGG TTA GCG AAT GGA CTG 3'
146 R3	5' CGA AGA GTA GTG TTA GAA GAG GA 3' (Lo y cols., 1996; 1998).
WSSV)6581	5' TGT AGC AGC AGA GAA GAG 3'
7632	5' ACT GCA CCA AAT TGT CCA CC 3' (Nunan y Lightner, 1998)
RV-PJ y SEMBV)	5' GAC ACA GAT ATG CAC GCC AA 3'
	5' ACC AGT GTT TCG TCA TGG AG 3' (Takahashi y cols., 1996)
WSS) 102F1:	5' TCA CAT CGA GAC CTC TGT AC 3'
102R1	5' TCT AGG ACG GAC TAT GGC AA 3 Kasomchandra y cols., 1998).
WSBV)FOO1	5' CCA GAA TTG GAC ATG ATG TGG C 3'
ROO2	5' GCG TCT CTG CAA ACA ATG TAG TGA 3' (Klimpel, com. pers., 1999)
18 S rRNA de decápodos	
143 F	5' TGC CTT ATC AGC TNT CGA TTG TAG 3'
145 R	5' TTC AGN TTT GCA ACC ATA CTT CCC 3' (Kim y Abele, 1990; Lo y cols., 1996).

**C.- Control positivo:** Este consistió de un aislado tailandés del virus WSSV, amablemente donada por el Dr. Kurt Klimpel (Aquadiagnostics, San Diego, CA). Con este fue estandarizada la técnica, desarrollándose un protocolo de PCR simple, PCR en dos pasos o ("nested") y un formato de PCR múltiple.

**D.- Control negativo:** Consistió en agua desionizada, estéril, en presentación de ampollitas de 1 ml (IMSS). También se utilizó DNA del plásmido  $\rho$  Bluescript SK<sup>+</sup>, purificado por medio de la técnica de lisis alcalina (Birnboim y Dolly, 1979).

**E.- Amplificación del DNA del virus WSSV a partir del DNA total extraído de los tejidos de camarón por la técnica de PCR múltiple (Multiplex):** Las muestras de DNA usadas en el proceso de amplificación totalizaron 0.2- a 0.3 mg/ml, agregándose 2  $\mu$ l a la mezcla de reacción. Esta contenía Tris-HCl 10 mM; pH 9 a 25 °C; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; Triton-X 0.1 %; dNTP 200 mM de cada uno; 100 pmol de cada iniciador (146 F1/146R1; 146 F4/146R3; FOO1/ROO1; 1F/1R; 6581/7632; 102 F1/102 R1) y 2.5 U de Platinum Taq DNA Polimerasa (Life

Technologies, Inc., Gibco BRL, Grand Island, NY). Esta enzima permite la aplicación de la técnica en la modalidad conocida como "hot start", adicionándola junto con el resto de los componentes del cóctel. La amplificación se efectuó en un termocilador MJ Research, con el siguiente programa:

- Paso 1: 94 °C      4 min
- Paso 2: 55 °C      1 min
- Paso 3: 72 °C      3 min
- Paso 4: 94 °C      1 min
- Paso 5: 55 °      1 min
- Paso 6: 72 °C      3 min
- Paso 7: Ir al Paso 4. Repetir 30 veces.
- Paso 8: 72 °      5 min
- Paso 9: Conservar a 4 ° por tiempo indefinido.
- Paso 10: Fin.

**F.- PCR simple:** Las condiciones de la reacción fueron las mismas, la variación fue que se agregó un par de iniciadores diseñados por Kim y cols., 1998; Klimbel (com. pers.) o uno de los descritos por Lo y cols. (1998).

**G.- PCR en dos pasos (Nested PCR):** Este se desarrollo de acuerdo a la técnica descrita por Lo y cols. (1996, 1998) y consistió en realizar el primer PCR con el par externo de iniciadores 146 F1/146 R1. Después de completar este primer paso, se tomaron 10 µl de la mezcla de reacción y se agregaron a un segundo cóctel de PCR, con el par interno de iniciadores 146 F2/146R2, sometiéndolo a una segunda ronda de ciclos de amplificación. Esta modalidad permite aumentar la sensibilidad hasta  $10^3$  -  $10^4$  veces mayor que el PCR en un solo paso (Fig. 4).

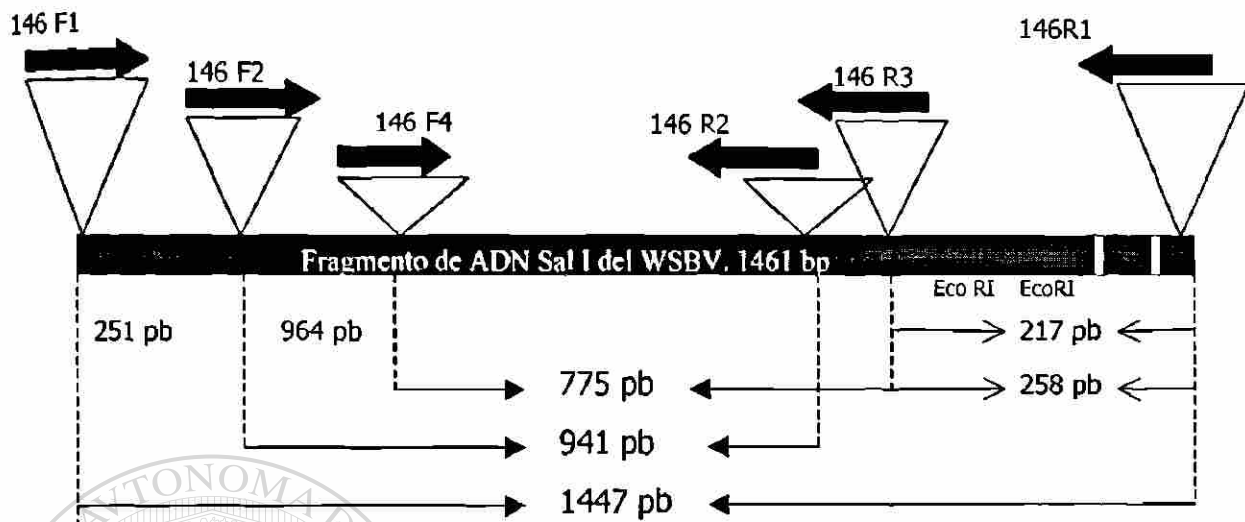


Fig. 4. Esquema de amplificación por la técnica de PCR en dos pasos (Nested PCR) o PCR anidado).

**H.- Amplificación del DNA de camarón como control:** En los análisis de PCR se utilizaron iniciadores específicos para amplificar el DNA genómico del camarón. Lo anterior para monitorear la calidad del DNA extraído. Los iniciadores utilizados amplifican la región altamente conservada de una secuencia 18S rRNA de decápodos. Los iniciadores denominados 143 F y 145 R, amplifican un producto de 848 pares de bases (pb), que corresponden a las secuencias 352 a 1200 del rRNA 18S del camarón *Fa aztecus*. Las secuencias fueron obtenidas de un archivo de secuencias de decápodos, basados en el trabajo de Kim y Abele (1990) y en el estudio de Lo y cols. (1996) aplicado a *P. monodon*.

**I.- PCR en ejemplares del primer muestreo:** Los mismos procedimientos de PCR se realizaron con ejemplares congelados del primer muestreo para determinar la posible presencia del WSSV en los ejemplares, debido al cuadro clínico parcialmente similar que ambas etiologías presentan. Además de que el WSSV se conocía desde 1993 en el Hemisferio Oriental.

## RESULTADOS

### I. CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL SINDROME DE TAURA Y LA ENFERMEDAD QUE CAUSA

Todos los estudios de caracterización se realizaron con el material colectado en el primer muestreo. La muestra de camarones cultivados en granjas de San Blas, Nayarit; Guasave, Los Mochis, Sinaloa y San Luís Río Colorado, Sonora, procesados para la detección del agente causal de los brotes epizooticos, fueron positivas. En el proceso de ultracentrifugación se aislaron partículas virales, icosaédricas, observadas al MET (datos no mostrados). Al inocular las bandas de los gradientes en camarones sanos, se logró reproducir la patología típica del virus del síndrome de Taura (VST), descrita en *L. vannamei* cultivados en Ecuador mediante los bioensayos. Para cada una de las localidades se realizó un proceso diferente de ultracentrifugación.

#### 1.- Purificación de virus por gradientes de densidad:

**A.- Gradientes de sacarosa:** En los gradientes discontinuos se observaron 2 ó 3 bandas. La banda intermedia, situada entre el gradiente 30% y 40% fue la que contenía la mayor cantidad de partículas virales, siendo estas por consiguiente más escasas en la banda superior localizada entre el gradiente 30% y 20% y la banda inferior, localizada entre el gradiente 50 y 40% de sacarosa, tal como se determinó al MET (datos no mostrados).

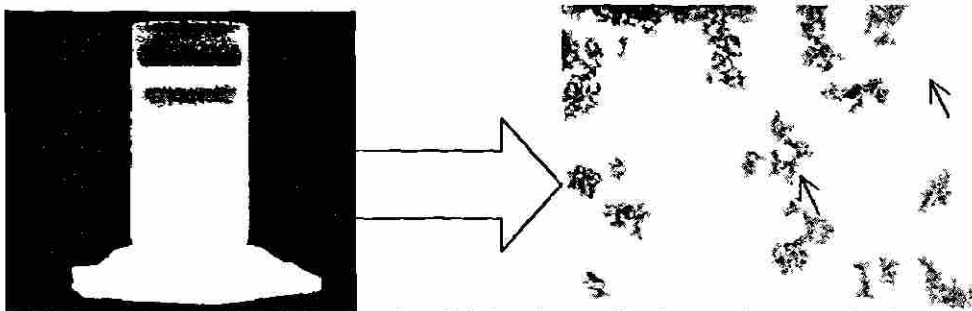


Fig. 5. Purificación de partículas virales. (A) Gradiente de cloruro de cesio donde se presentan dos bandas analizadas (B) Tinción negativa observada al MET (25, 000 X).

**B.- Gradiente de cloruro de cesio:** Las lecturas de absorvancia en las fracciones eluídas (a una longitud de onda de 340 nm), registradas para cada ensayo, se complementaron la lectura del IR para determinar la densidad de las fracciones obtenidas, según la observación del bandeó (Fig. 5). Los resultados obtenidos en los cuatro procedimientos, correspondientes a cada localidad, reportan en tres de ellos la presencia de dos importantes picos. Sin embargo uno de los picos que se presentó con mayor acentuación, no correspondió a la densidad esperada del virus, sino a material identificado como restos celulares o posibles fragmentos protéicos arrastrados durante el proceso de maceración y purificación.

La presencia evidente de un segundo pico (menos acentuado en tres ensayos), o único (en el cuarto ensayo), corresponde a lecturas de 0.25 (tubo 8), 0.08 (tubo 5), 0.07 (tubo 6) y 0.5 (tubo 5) a una absorvancia de 340 nm, en los procedimientos de purificación realizados en material infectado de San Blas, Guasave, Los Mochis y San Luis Río Colorado, respectivamente. Las lecturas del IR, en general, fueron de 1.363, 1.364, 1.367 y 1.365 para cada una. Al aplicar la formula:

$$\rho = 10.2402 (n) - 12.6483$$

Donde  $\rho$  es la densidad de la fracción en  $\text{g ml}^{-1}$  en CsCl.

$n$  corresponde a la lectura del índice de refracción

Los resultados indican densidades que oscilaron entre 1.31 a 1.34  $\text{g ml}^{-1}$ .

El ámbito de las densidades calculadas, es el que corresponde a las familias Birnaviridae (1.33  $\text{g ml}^{-1}$ ); Calciviridae (1.33-1.39  $\text{g ml}^{-1}$ ); Nodaviridae (1.30-1.35  $\text{g ml}^{-1}$ ) y Picornaviridae (1.33-1.45  $\text{g ml}^{-1}$ ) del grupo de los RNA virus (Trudel y Payment, 1993). En los DNA virus, los Adenoviridae presentan una densidad de 1.33-1.35.  $\text{g ml}^{-1}$  Coincidentemente, todos ellos corresponden a virus desnudos

(sin envoltura) (Trudel y Payment, 1993). Las lecturas de absorvancia e índices de refracción se describen a continuación.

**C.- Purificación viral del material procedente de San Blas, Nayarit:** El primer pico correspondió a lecturas de absorvancia de 0.0598, 1.1903 y 0.0360. En el segundo, el rango fue de 0.0360 a 0.0020 (Tabla 3, Fig. 6).

La absorvancia registrada en el segundo pico, que contenía las partículas virales, fue de 0.0824 y a un IR= 1.3630. La densidad calculada ( $\rho$ ) con base en el valor obtenido del IR, fue de 1.320 g ml<sup>-1</sup>. Estos datos son los que corresponden a la fracción 5 de los eluidos del gradiente de la muestra procesada.

Tabla 5. Absorvancia de las fracciones obtenidas de los gradientes de CsCl del material colectado en Nayarit. Proceso de purificación de virus a partir de casos agudos observados en *L. vannamei* de granjas situadas en San Blas, Nayarit.

Tubo de elución	A 340 nm	I.R.	Densidad
<b>1</b>	0.0598	1.3410	1.083
<b>2</b>	1.1903	1.3440	1.114
<b>3</b>	0.0360	1.3490	1.165
<b>4</b>	0.0669	1.3550	1.227
<b>5</b>	<b>0.0824</b>	<b>1.3630</b>	<b>1.320</b>
<b>6</b>	0.0050	1.3680	1.360
<b>7</b>	0.0030	1.3730	1.411
<b>8</b>	0.0020	1.3800	1.483
<b>9</b>	0.0020	1.3830	1.513
<b>10</b>	---	---	---
<b>11</b>	---	---	---
<b>12</b>	---	---	---



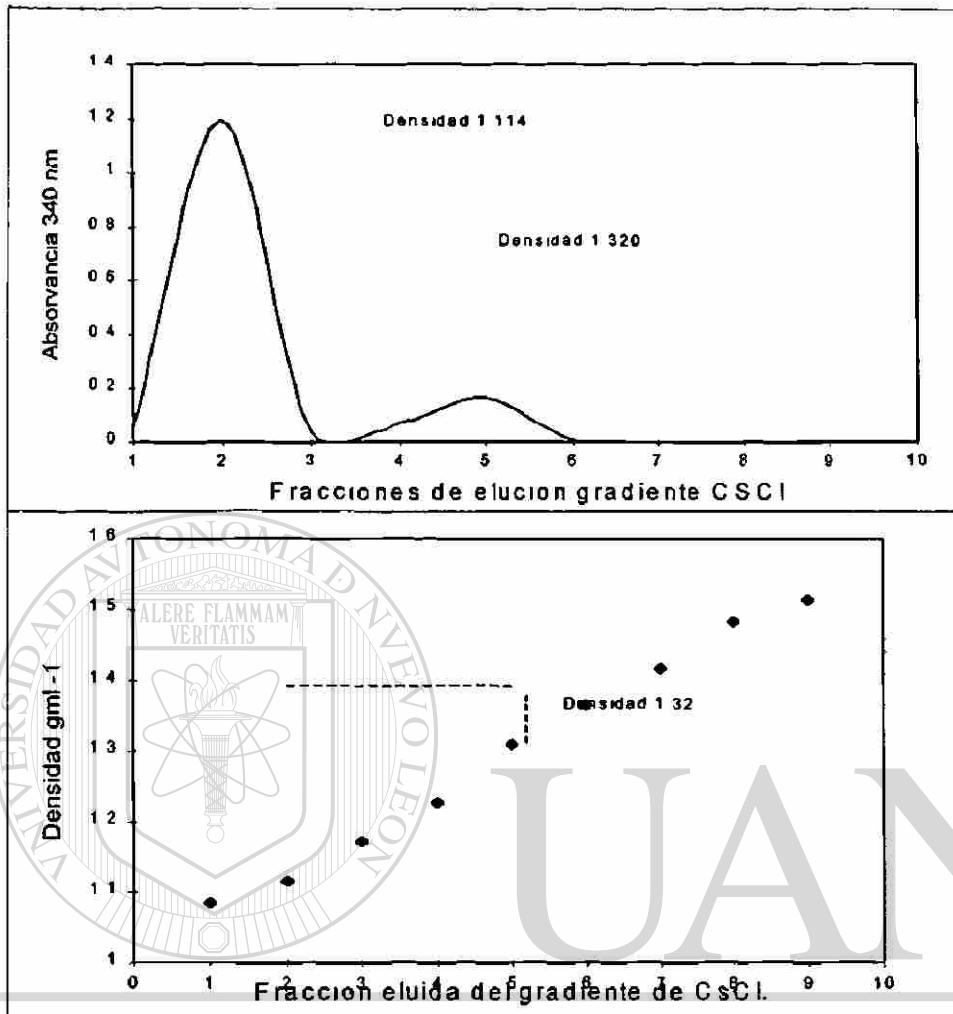


Fig. 6. Absorvancia y densidad en las fracciones de los gradientes eluidos de muestras de Nayarit. (A) Absorvancia de las fracciones. (B) La densidad del segundo pico corresponde a 1.32 g/ml<sup>1</sup>.

**D.- Purificación viral del material procedente de Guasave:** Las lecturas de absorvancia del segundo pico (Fig. 7) fueron de 0.0148 a 0.0073. La lectura de 0.0786 fue la que correspondió a la fracción de mayor concentración de partículas virales. La densidad correspondiente de esta, fue de 1.31-1.34 g/ ml<sup>-1</sup>, de acuerdo a las lecturas del IR obtenidos (1.3620 y 1.3670). En la Tabla 4 y Fig 7, se cita también la lectura de densidad del primer pico donde se detectó material proteínico, y restos celulares, la cual fue de 1.24 g/ml<sup>-1</sup>.

Tabla 6. Absorvancia de las fracciones s de los gradientes de CsCl en el proceso de purificación de virus a partir de casos crónicos observados en *L. vannamei* de granjas situadas en Guasave, Sinaloa.

Tubo de elución	A 340 nm	I.R.	Densidad
<b>1</b>	0.0856	1.3435	1.109
<b>2</b>	0.2373	1.3450	1.124
<b>3</b>	0.0122	1.3510	1.186
<b>4</b>	0.0222	1.3570	1.247
<b>5</b>	0.0148	1.3610	1.293
<b>6</b>	<b>0.0786</b>	<b>1.3620</b>	<b>1.313</b>
<b>7</b>	<b>0.0086</b>	<b>1.3670</b>	<b>1.340</b>
<b>8</b>	0.0073	1.3660	1.355
<b>9</b>	0.0003	1.3700	1.380
<b>10</b>	0.0003	1.3760	1.442
<b>11</b>	0.0003	1.3760	1.447
<b>12</b>	0.0002	1.3845	1.529

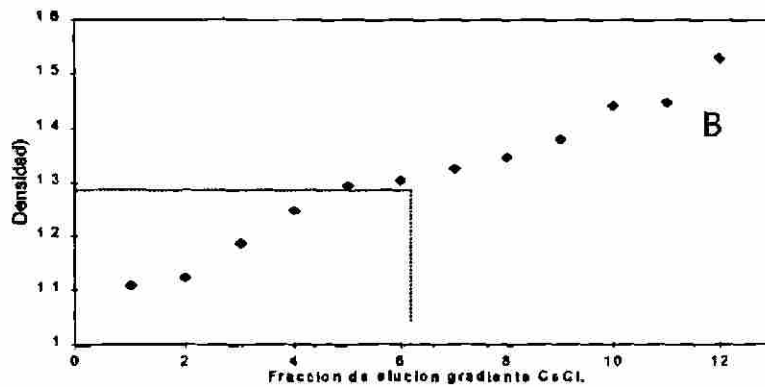
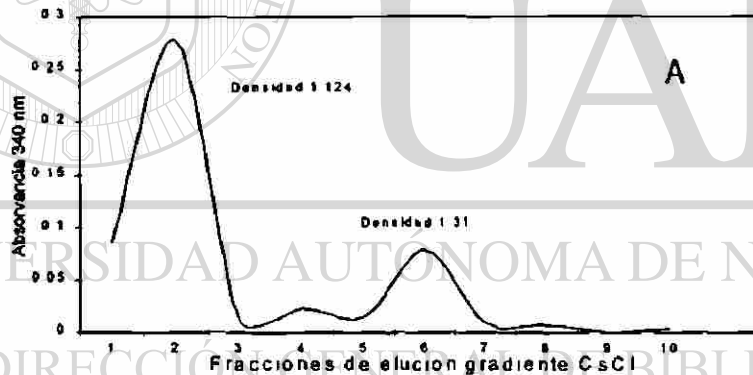


Fig. 7. Absorvancia de las fracciones de virus purificadas del material colectado de Guasave. (A) Absorvancia y (B) densidad correspondiente de las fracciones obtenidas con base en los datos calculados del índice de refracción

**E.- Purificación viral del material procedente de Los Mochis:** El material procesado corresponde a camarón azul (*L. stylirostris*). Estos organismos eran adultos, de 20-22.1 g de peso. Los ejemplares se observaron a simple vista con expansión de cromatóforos rojos en todo el cuerpo, particularmente en apéndices, como son pereopodos, pleopodos, uropodos, telson y antenas, pero a la vez, la tercera parte de la población estudiada presentó el curso crónico del síndrome referido en otros países latinoamericanos como síndrome de Taura. Este consistía en necrosis cuticular extensiva, similar a la ocasionada por bacterias del género *Vibrio* sp. La muestras de 5 kg de camarón, fue enviada al CNSA para análisis, debido a la mortalidad extensiva que se detectó en la estanquería. Como dato extraordinario, se menciona que el reporte del síndrome en camarón azul es raro, debido a que no es un hospedero preferencial para el virus de Taura. La fracción con las partículas virales se detectó a partir del tubo 4 (Tabla 5, Fig 8; DO 0.1855), culminando en el tubo 7 (0.0482) y terminando en el tubo 9 (0.0058).

Tabla 7. Absorvancia y densidad analizadas con muestras de *L. stylirostris*, cultivados en Los Mochis, Sinaloa. La densidad se calculó como se describe en la metodología.

Tubo de elución	A 340 nm	I.R.	Densidad
1	0.0081	1.3450	1.124
2	0.0043	1.3460	1.146
3	0.1844	1.3500	1.175
4	0.1855	1.3538	1.214
5	0.6908	1.3570	1.247
6	0.1150	1.3600	1.278
7	0.0482	1.3630	1.320
8	0.2535	1.3670	1.350
9	0.0058	1.3720	1.401
10	0.1160	1.3780	1.462
11	0.0049	1.3820	1.503
12	0.0071	1.3830	1.513

En el proceso de purificación viral, en gradientes de cloruro de cesio, se detectó el segundo pico, graficado con las lecturas de absorvancia a 340 nm. La lectura correspondiente fue de 0.0492 en la fracción 7, Fig. 8). Esta misma, presentó una lectura de índice de refracción de 1.3630. Al aplicar la fórmula  $\rho$ , se calculó una densidad de 1.320 g/cm<sup>3</sup> para la misma fracción. Al igual que el resto de las fracciones con esta característica, ésta fue inoculada en camarones sanos, de laboratorio, para reproducir el cuadro clínico y una segunda muestra se utilizó para observación al MET. Los datos obtenidos se describen en la Tabla 5, Fig. 8.

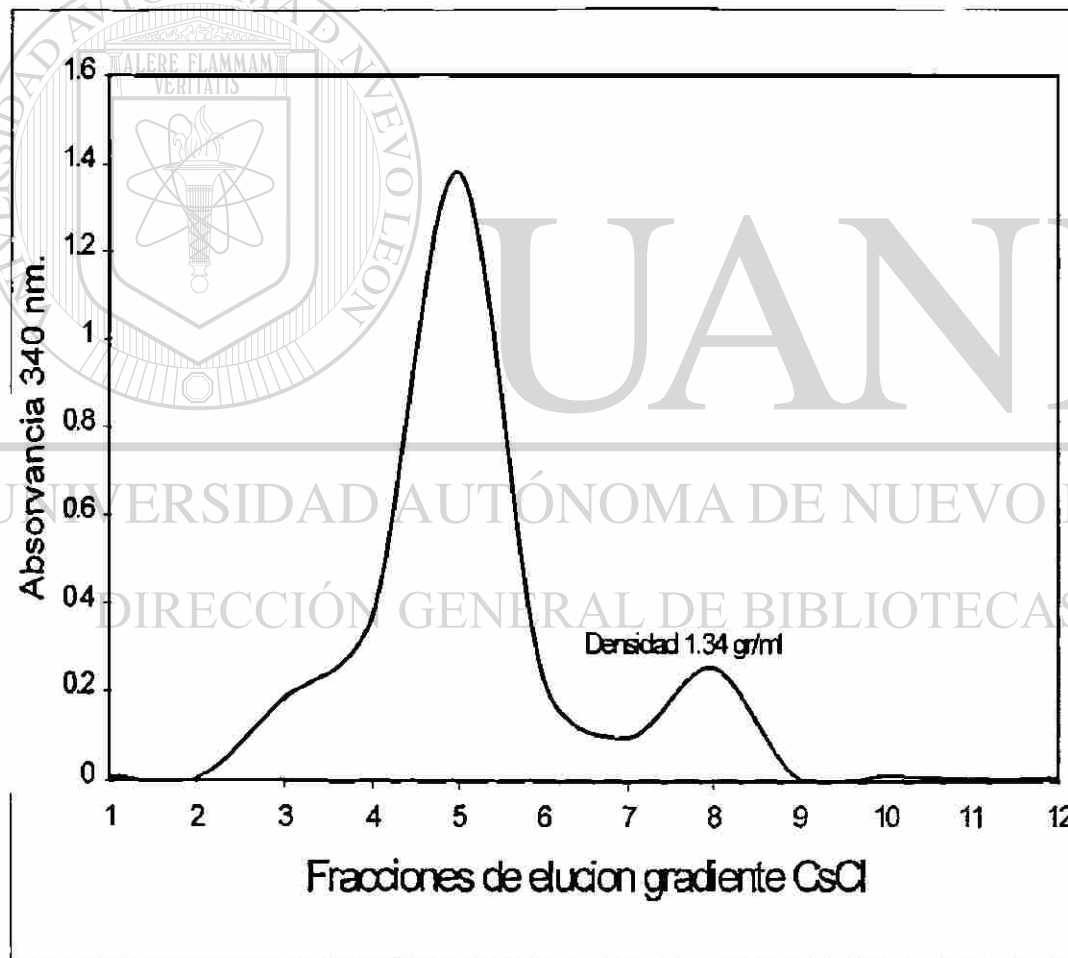


Fig. 8 A. Gráfica de absorvancia de las fracciones obtenidas en gradiente de cloruro de cesio, a partir de las muestras colectadas en Los Mochis, Sinaloa.

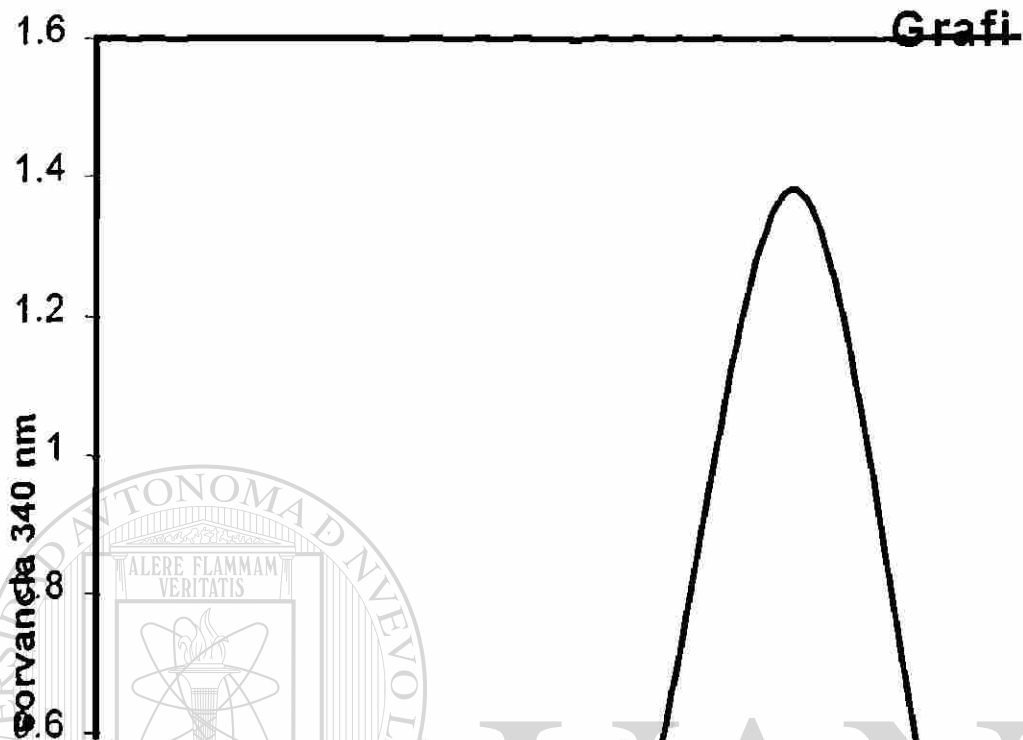


Fig. 8B. Gráfica de la densidad ( $\text{gml}^{-1}$ ) de cada fracción, obtenidos con base en las lecturas del índice de refracción.

#### F.- Purificación viral del material procedente de San Luis Río

**Colorado:** Los organismos procesados por ultracentrifugación, corresponden a una epizootia detectada en la fase aguda del síndrome, la cual afectó a *L. vannamei* en forma masiva. Estos organismos presentaron un peso promedio de 15 g, y exhibían la expansión de cromatóforos, característica de la fase mencionada.

La densidad de la fracción eluida, correspondiente al tubo 5, se determinó en  $1.334 \text{ gml}^{-1}$ , de acuerdo a la lectura de índice de refracción (1.3650) y a la lectura de absorvancia (0.5337).

Las fracciones eluidas, 4, 5 y 6 correspondieron al único pico detectado en los gradientes con una densidad que correspondía a partículas virales (Tabla 6, Fig. 9).

Tabla 8. Lecturas de las muestras correspondientes a fracciones eluidas de camarones *L. vannamei* en la fase aguda del síndrome, originaria de San Luis, Río Colorado.

Tubo de elución	A 340 nm	I.R.	Densidad
1	0.0020	1.3425	1.099
2	0.0020	1.3440	1.114
3	0.0020	1.3460	1.140
4	0.0148	1.3520	1.196
5	0.5337	1.3650	1.334
6	0.0153	1.3980	1.667
7	0.0153	1.4000	1.696
8	0.0025	1.4010	1.696
9	0.0509	1.4110	1.801

La densidad de la fracción eluida del tubo 5, fue de  $1.334 \text{ g ml}^{-1}$ , de acuerdo al  $\text{IR}=1.3650$ .

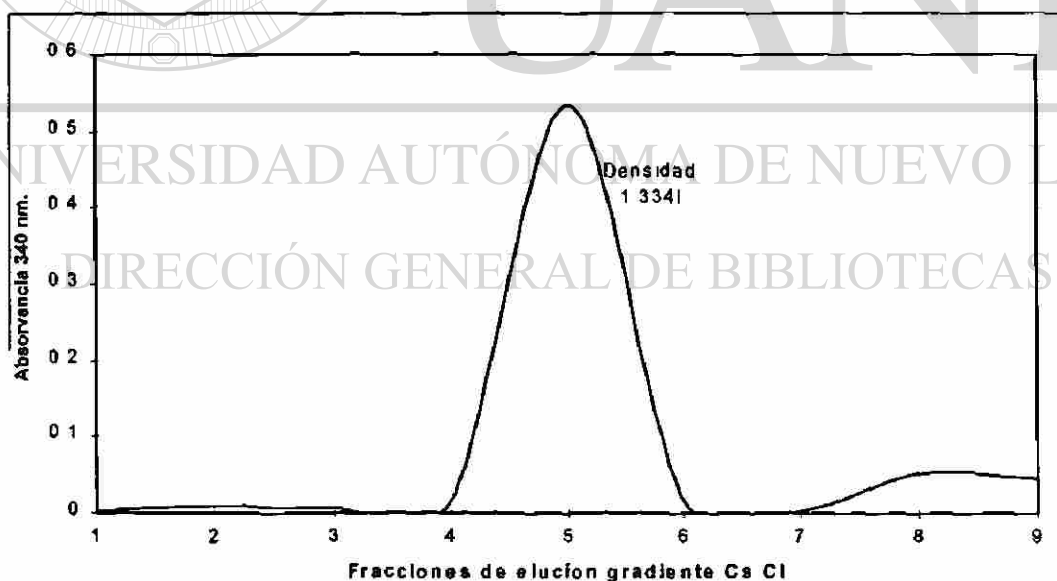


Fig. 9 A. Gráfica de absorvancia de las fracciones del material procedente de San Luis Río Colorado, Sonora. Note que este presentó un solo pico.



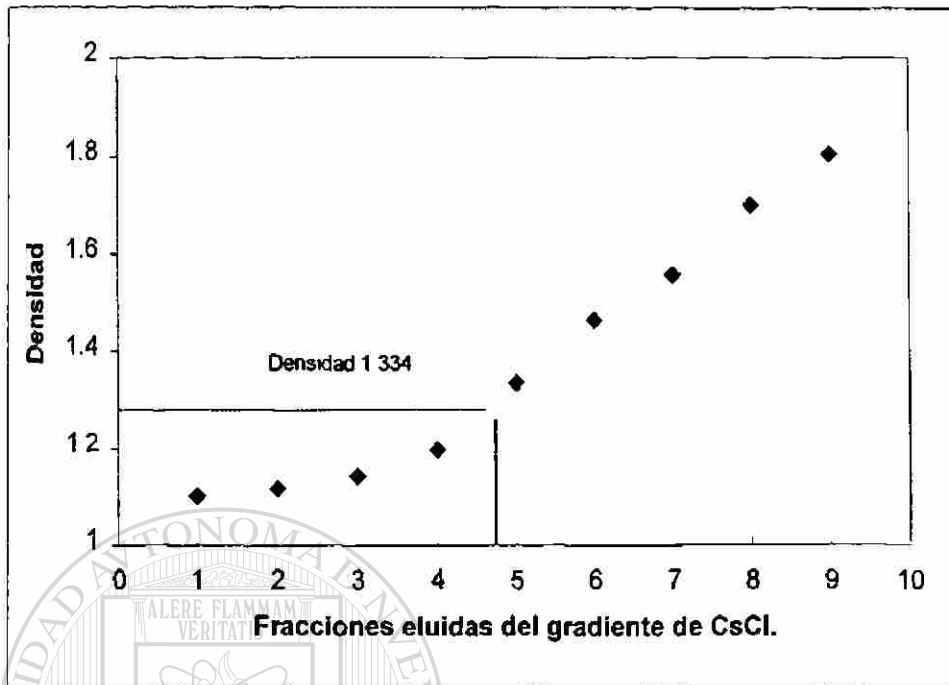


Fig. 9B. Gráfica de la densidad ( $\text{g ml}^{-1}$ ) para determinar el valor correspondiente del IR para el tubo eluido de la fracción 5.

## 2.- Microscopía electrónica de transmisión

**A.- MET de las fracciones eluidas:** Las fracciones donde se detectaron lecturas de densidad correspondientes a partículas virales, provenientes de los gradientes de cloruro de cesio, presentaron partículas entre un rango de 31-32 nm de diámetro máximo, con 5 a 6 lados en la periferia, lo cual indica que se trata de partículas icosaédricas, según las observaciones realizadas al MET con la tinción negativa de ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo.

Los cuatro procedimientos realizados de acuerdo a los sitios de colecta de material biológico (San Blas, Nayarit; Guasave y Los Mochis, Sinaloa y San Luis Río Colorado, Sonora), coincidieron al presentar partículas icosaédricas con las dimensiones mencionadas anteriormente. En las figuras 10 y 11 se presentan las observaciones realizadas al MET.

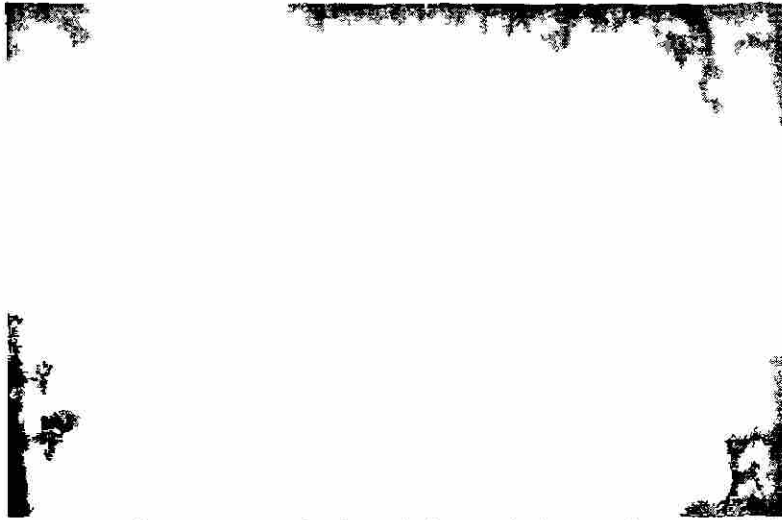


Fig. 10. Microfotografía tomada a 25,000 X de partículas virales icosaédricas teñidas con ácido fosfotúngstico, donde se observa la cápside electrolúcida y material genómico electrodenso.

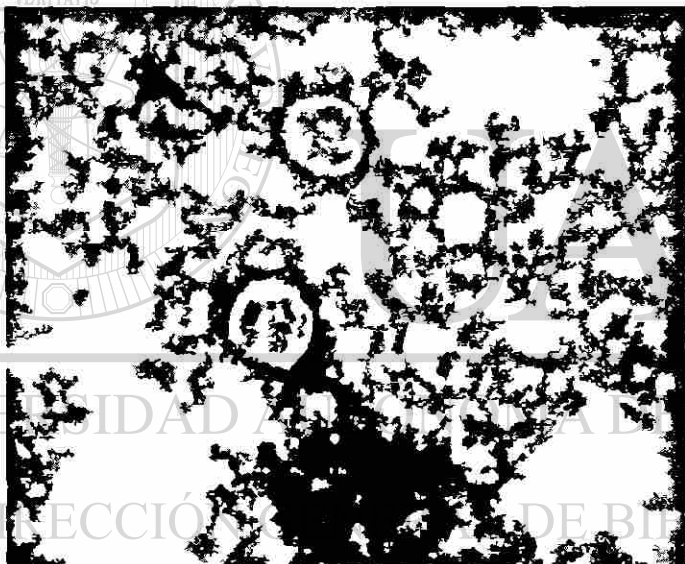


Fig. 11. Partículas virales obtenidas de muestras de camarón infectado con VST, procedentes de Nayarit, Sonora y Sinaloa, México (25, 000 X).

**B.- MET de camarones infectados:** En el tejido fijado con glutaraldehído, proveniente de los organismos infectados, se detectaron partículas esféricas, de 31 a 32 nm de diámetro, al observarse a 132, 500 X (Fig. 12).

Además de la presencia de partículas esféricas ó icosaédricas y sin envoltura, se observaron cristales aparentemente de fosfato de calcio. La muestra de tejido mostrada en la figura 12, fue tomada del dorso de uno de los camarones infectados experimentalmente.

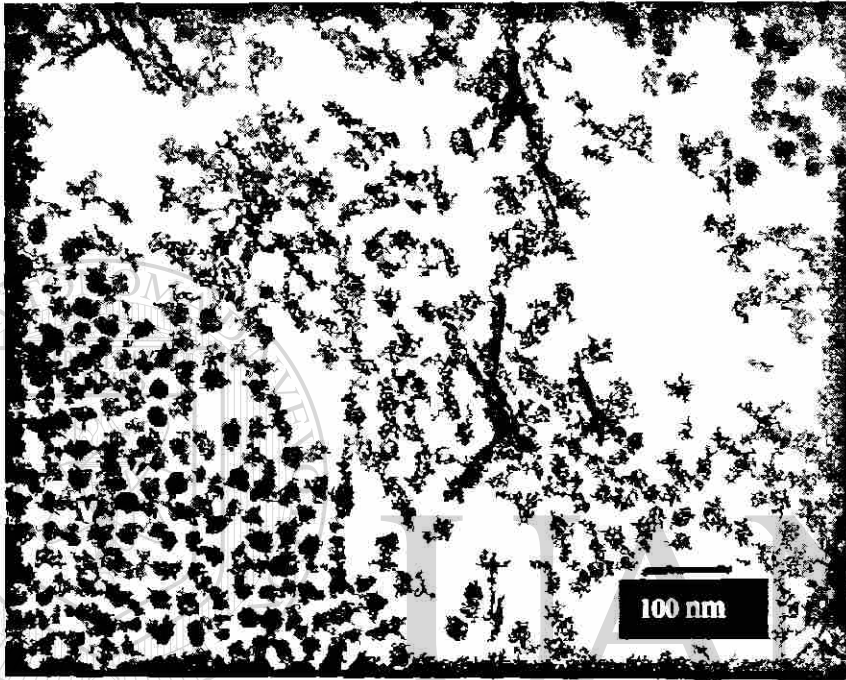
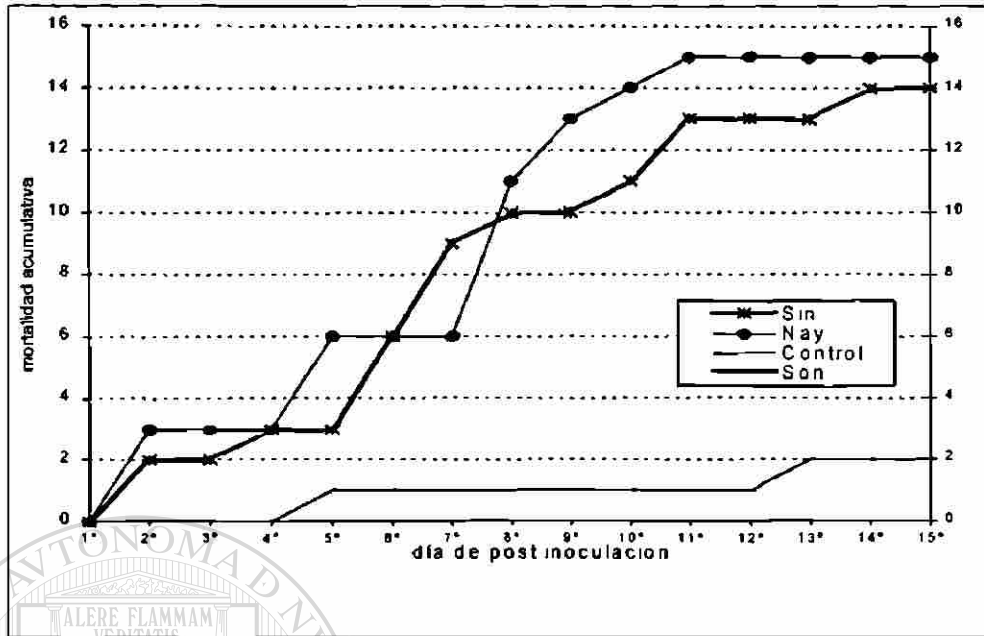


Fig. 12. Ultraestructura de un corte de tejido de *L. vannamei* infectado experimentalmente, mostrando los viriones icosaédricos, que constituyen los cuerpos de inclusión citoplásmicos (V) y cristales de fosfato (F). 135, 200 X.

### 3.- Ensayos de bioinfectividad

Las características clínicas del síndrome de Taura se observaron a partir del segundo día en los *L. vannamei* inoculados con las suspensiones virales purificadas de camarones cultivados en Nayarit, Sinaloa y Sonora. El cuadro inició con una coloración rojiza en los urópodos y antenas y nado repentino de extremo a extremo del acuario en forma intermitente. Los signos indicativos coincidieron con el cuadro preagudo y agudo de la enfermedad conocida como virus del síndrome de Taura (Lightner y cols., 1997).



	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°
Temp (°C)	28	28	30	30	30	30	30	30	30	30	30	31	30	30	30
(Salinidad°/oo)	25	25	25	26	26	26	25	25	25	25	25	25	25	25	25
pH	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.9	7.9	7.9	7.8	7.8	7.8	7.9	7.8	7.8	7.8
ma	2	2	3	3	6	9	10	10	11	13	13	13	14	14	14

Fig. 13. Bioensayo efectuado con 15 *L. vannamei*, inoculados con partículas virales del material colectado en Sonora y Sinaloa, bandeadas en gradiente de cloruro de cesio. La tabla de datos muestra los parámetros físicos del agua del bioensayo (ma= mortalidad acumulativa).

**A.- Inóculo viral procedente de Sonora y Sinaloa:** Con la suspensión viral de ambas localidades, se obtuvo el mismo resultados de mortalidad acumulativa y sobrevivencia (%). Dos de los ejemplares inoculados con la suspensión viral, murieron al segundo dpi, mientras que al octavo dpi, la mortalidad acumulativa fue de 10 organismos. En la Fig. 13 se observan con detalle los datos, quedando solo un sobreviviente con los signos indicativos (macroscópicos) durante el experimento del primer bioensayo realizado con 15 organismos.

En los bioensayos experimentales se observó sobrevivencia del 33.3% hasta el octavo dpi. En el décimo dpi la mortalidad aumentó al 73.3 %, pero al llegar al

14 dpi, se registró la máxima que fue de 93.33 %, sobreviviendo uno de 15 organismos inoculados (6.7 %, Fig. 14).

En el grupo control, constituido de 15 ejemplares del mismo origen y especie, la mortalidad acumulativa alcanzó el 13.3 % (2 organismos) en el mismo periodo de tiempo. Con respecto a los factores físicos determinados, no se observaron cambios trascendentales en el grupo control y en el grupo del ensayo de infectividad (Fig. 13).

El índice de sobrevivencia, expresado en porcentaje, detectándose que al tercer dpi la sobrevivencia alcanzó el 86.7 %, disminuyendo progresivamente hasta el 33.3 % en el noveno dpi, 26.6 % en el décimo dpi y al final del seguimiento se detectó un 6.7 % de organismos sobrevivientes, los cuales, como se indica anteriormente, presentaban signos clínicos del STV (Fig. 14).

**B.- Inóculo viral procedente de Nayarit:** La mortalidad acumulativa se mantuvo en el 20 % (3 ejemplares) del segundo al cuarto dpi (80 %) de sobrevivencia. Del quinto al séptimo esta aumentó al 40 % (6 organismos). En el décimo llegó al 93.3 %, contabilizándose 14 organismos, con un solo sobreviviente (6.7 % de sobrevivencia). Al décimo primer dpi, el índice de sobrevivencia llegó al 100 %. Los signos clínicos macroscópicos de los ejemplares se presentaron entre el segundo y tercer día en la población inoculada, coincidiendo con los descritos anteriormente.

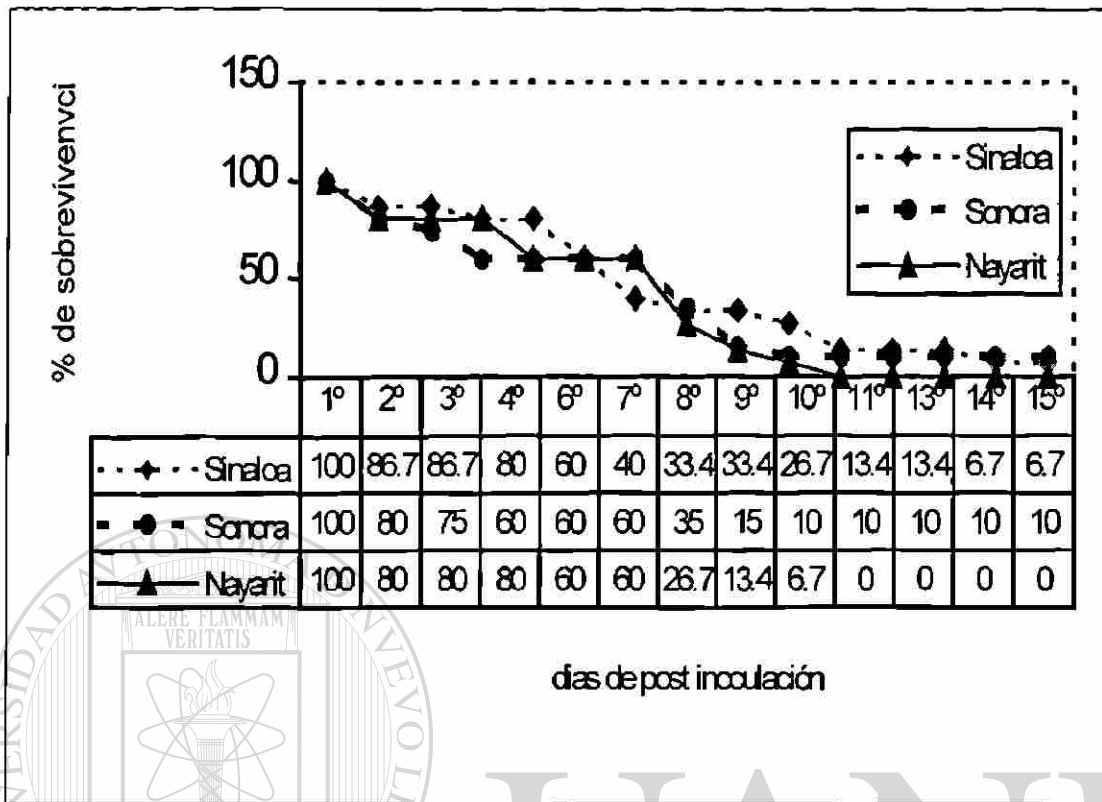


Fig. 14. Índice de sobrevivencia en los bioensayos efectuados con inóculos de las localidades de estudio.

En los bioensayos realizados, no se observó el inicio de la fase crónica que debía consistir en el desarrollo de lesiones cuticulares melanizadas multifocales, descritas para el virus del síndrome de Taura (Hasson y cols., 1995).

#### 4.- Hibridación de ácidos nucleicos

**A) Hibridación en membranas de soporte sólido:** Para esta fase confirmatoria de la identificación del agente causal, fueron seleccionadas dos muestras (3 µl de cada una) de las fracciones obtenidas en los gradientes, más un control negativo que consistió en tejido de sementales sanos, de laboratorio, provenientes de Florida, procesados con la misma técnica de ultracentrifugación (Fig. 15).



Los resultados observados son los siguientes: Las fracciones eluídas de los gradientes de cloruro de cesio presentaron resultados positivos, hibridizando con la sonda comercial. La diferencia en la señal de hibridación, proporcionada por la reducción del substrato (BCIP/NBT), se observa más aumentada en las muestras de Sinaloa y menos acentuada en los eluídos de Sonora, pero esto se debe a la concentración de las partículas virales en la muestra eluída. El control negativo (muestra 4) y positivo (+) se presentan en la misma membrana de prueba. La extracción de RNA se realizó con la técnica de Trizol, mencionada en la metodología.

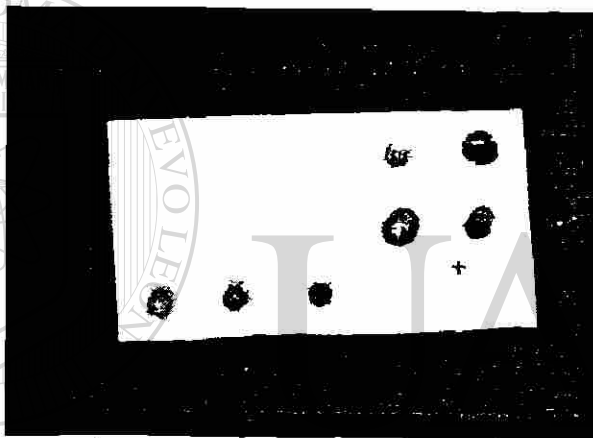


Fig. 15: Hibridación en membrana de soporte sólido realizado en las fracciones eluídas de los purificados virales con la sonda comercial DiagXotics. 1 - 2: Fracciones de camarones cultivados en Sonora. 3 y 5: Fracciones de purificados virales de Sinaloa. 6 y 7: Fracciones originarias de granjas de Nayarit. 4: Control negativo. (+) Control positivo.

**B.- Hibridación *in situ*.** Los cortes histológicos, preparados con secciones de tejido proveniente de camarones con infección natural, así como los cortes de ejemplares fijados en los ensayos de bioinfectividad, presentaron reacción con la sonda en el citoplasma de las células infectadas con VST, así como el citoplasma de las células de tejido conectivo subcuticular. Los núcleos picnóticos o cariorecticos de las zonas lesionadas, no reaccionan con la sonda (Fig. 16 y 17). Las fracciones eluídas de las muestras de *L. stylirostris*, cultivada en Los Mochis, e inoculadas en *L. vannamei*, se presentan en la figura 17 A y de ejemplares estudiados de Sonora, con el mismo resultado positivo a la sonda figura 17 B.



Fig. 16. Corte de tejido subcuticular de camarón *L. vannamei* cultivado en Nayarit. El citoplasma de las células epiteliales se observa de color púrpura al estar infectadas con el virus.



Fig. 17. Hibridación in situ de células de tejido epitelial de la subcutícula de camarón. (A) Subcutícula de un pereopodo con áreas reactivas a la sonda marcada con DIG. (B) Subcutícula de la región dorsal del abdomen. El citoplasma de las células infectadas reaccionan apropiadamente con un color púrpura oscuro (flecha), pero no en los fragmentos de los núcleos cariorecticos y en los cortes de H & E.

## 5.- Microscopía de luz.

Una vez que se observaron los resultados de hibridación y de microscopía electrónica, algunos de los ejemplares fijados se utilizaron para determinar el cuadro histopatológico causado por el virus de Taura. Los cortes, teñidos con hematoxilina y eosina, demostraron la presencia de lesiones dispersas en la subcutícula, a nivel del epitelio, constituidas por cuerpos de inclusión citoplásmicos y esféricos, basofílicos, rodeados por células epiteliales necróticas, según lo refleja la fragmentación (cariorexis) y picnosis de los núcleos, sin observar hemocitos alrededor del tejido necrosado (Fig. 18) en comparación con un corte histológico de un ejemplar utilizado como control negativo (Fig. 19).

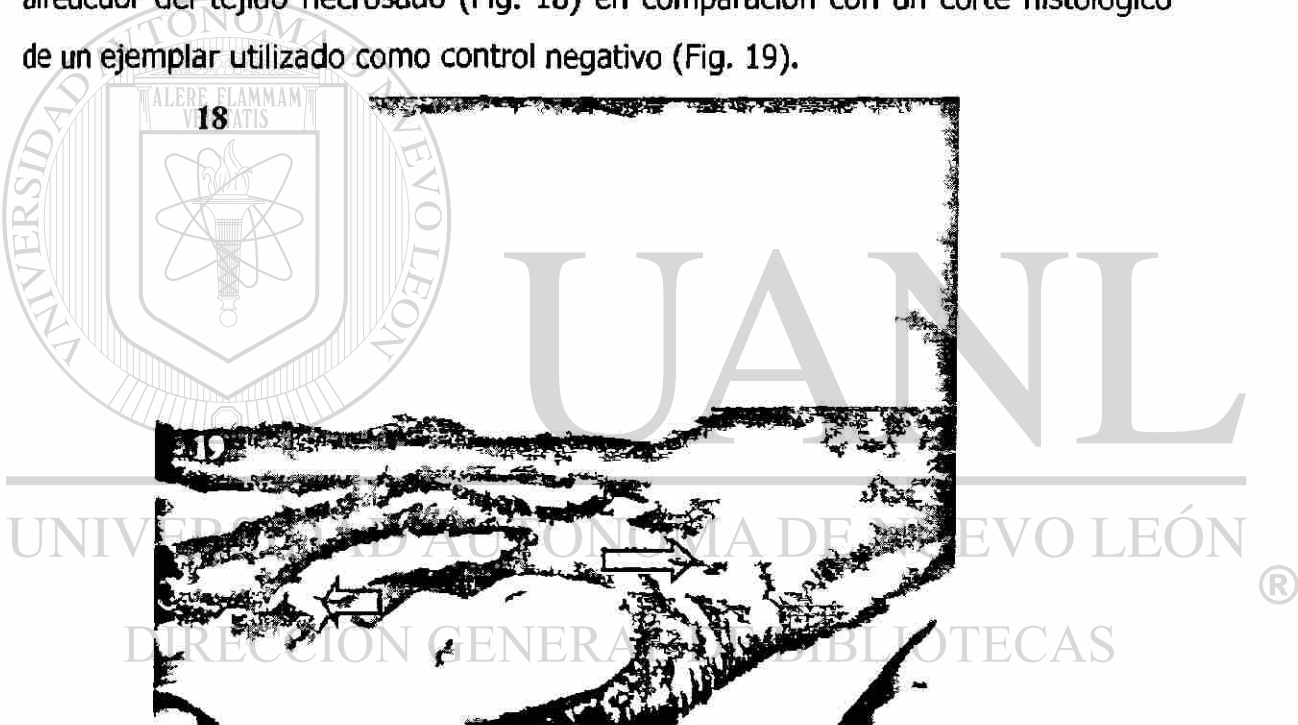


Fig. 18. Corte de epitelio subcuticular de un control negativo de *L. vannamei* donde se muestra la apariencia normal del epitelio y tejido conectivo subyacente. Fig. 19. Epitelio subcuticular con necrosis, enmarcada por la picnosis y cariorexis nuclear (flecha) junto con los cuerpos de inclusión citoplásmicos, esféricos. en la zona afectada.

## 6.- Electroforesis por SDS-PAGE:

Los corrimientos electroforéticos de las muestras que correspondían a los bandeos, se realizaron con material previamente lavado en solución amortiguador TN y precipitado a 45, 000 rpm.

**A.- Gradiente de sacarosa:** En la migración electroforética (Fig. 20), al graficarse los datos de la distancia recorrida (Tabla 9) en la abscisa  $x$  con el peso molecular de los marcadores ( $M_r$  en kD,  $y$ ), los datos se ajustaron a una curva exponencial ( $y=ae^{bx}$ ), gráfíandose estos en la Fig. 21 B.

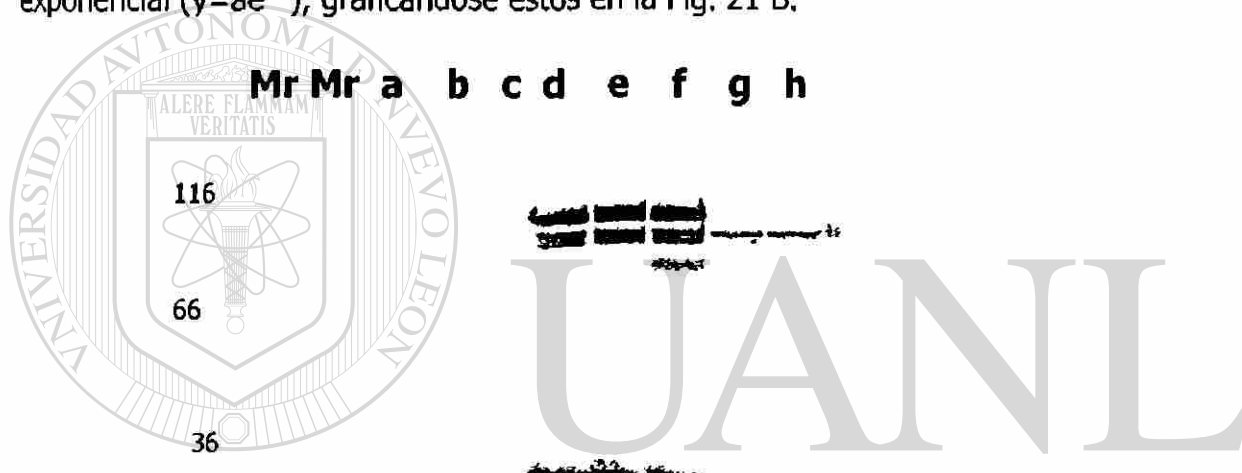


Fig. 20. Gel de poliacrilamida con las proteínas correspondientes a las fracciones de sacarosa.  $M_r$ = Marcadores de peso molecular (kD); a-c) Camarones infectados con el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV); d-f) camarones infectados con VST; g-h) controles negativos y camarones sanos provenientes de Costa Rica.

Las bandas de proteínas que caracterizaron el corrimiento electroforético, presentaron un peso molecular 161.21; 138.75; 130.68; 112.46; 73.89; 62.35; 47.1 y 34.89 kD. En la Fig. 21A se presentan la gráfica obtenida con los datos originales y en la Fig. 21B con el peso molecular estimado de acuerdo a la ecuación  $y=284.576 e^{-0.029x}$ . La F estimada fue de 244,244.84 con una significancia estadística de  $p < 0.01$  y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 1.0

Tabla 9. Datos numéricos de la migración electroforética del VST semipurificado en gradientes de sacarosa. Estos se aplicaron a la ecuación  $y = ae^{bx}$  para calcular el peso de las proteínas del virus.

Ecuación $y = ae^{bx}$			a: 284.576
x: Migración en mm delas Prot. Problema			
y: Peso en Kda Estimado por la ecuacion			P.M real
x	xb	$e^{bx}$	y = Peso en Kda
19	-0.57	0.5655	161.2127
21	-0.63	0.5325	151.8051
24	-0.72	0.4867	138.7484
26	-0.78	0.4584	130.6807
31	-0.93	0.3945	112.4641
43	-1.29	0.2753	78.4825
45	-1.35	0.2592	73.8927
51	-1.53	0.2187	62.3470
60	-1.8	0.1652	47.0952
70	-2.1	0.1224	34.8938
71	-2.13	0.1199	34.1811

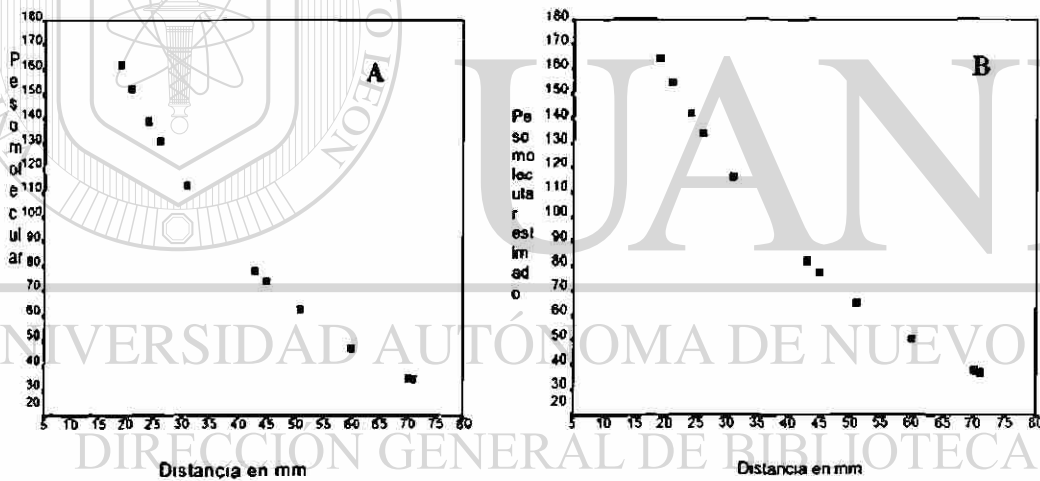


Fig. 21. Gráficas para determinar el peso de las proteínas del virus VST semipurificado en los geles de poliacrilamida. (A) Peso molecular con los datos originales y. (B) datos estimados de acuerdo a la ecuación  $y = ae^{bx}$ .

**B.- Gradientes de cloruro de cesio:** El patrón electroforético de las fracciones eluidas y seleccionadas de acuerdo a la lectura de absorbancia e índice de refracción se muestra en la Fig. 22, corriéndose en un gel de poliacrilamida al 10 %. Los datos originales se presentan en la Tabla 10 y en la gráfica de la Fig. 23A.

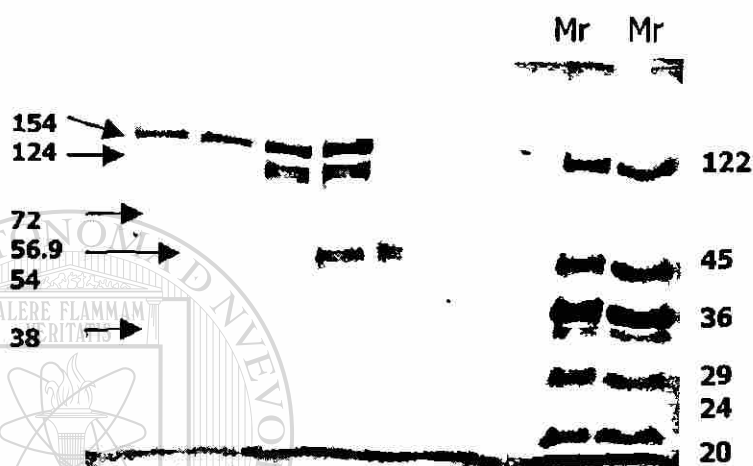


Fig. 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % de las fracciones eluidas de las bandas obtenidas en la purificación del VST en cloruro de cesio (Mr=Marcadores de peso molecular en kD).

La electroforesis en poliacrilamida, de los bandeos realizados en cloruro de cesio, mostraron la presencia de proteínas con un peso molecular de 154; 124; 72; 56.9; 54 y 38 kD.

La gráfica de la Fig. 23B se realizó con base al peso molecular estimado donde  $y = 210.139 e^{0.029 x}$ . La significancia  $p = 0.0001$  con un coeficiente de determinación  $r^2$  de 1.0 y  $F = 4,041,887.7$  (Fig. 23B).



Tabla 10. Datos numéricos de los valores obtenidos para el peso molecular (kD) de las proteínas electroforadas de las fracciones de cloruro de cesio.

x	y peso en kD	$x^p$
17	154 3685653	0.023094201
20	124 361525	0.018605018
21	116.5478513	0.017436059
30	72 52448684	0.010849975
36	56.90803728	0.008513687
37	54 87160207	0.008209027
40	49 46706517	0.007400485
47	39 91772504	0.005971863
48	38 81549131	0.005806964
61	28.22066561	0.004221933
67	24 91015591	0.003726666
71	23 06122269	0.003450058

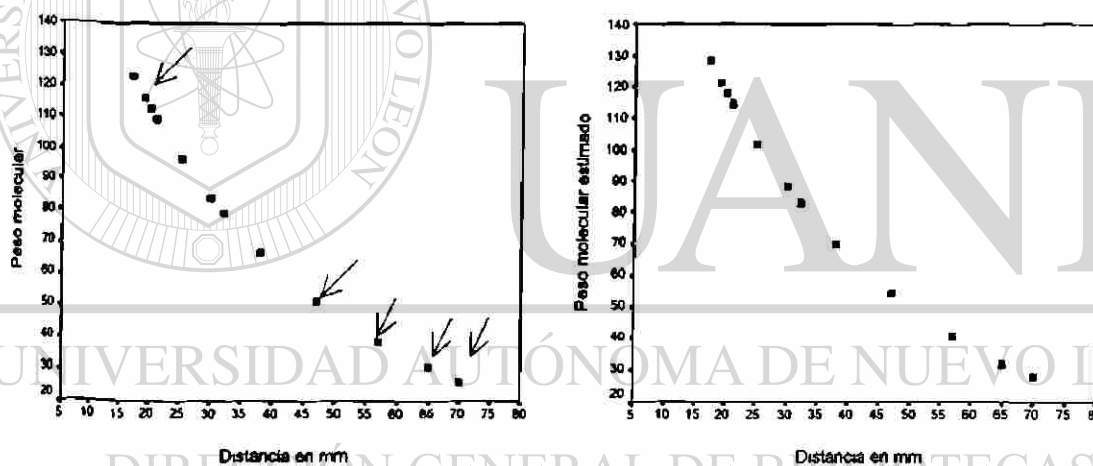


Fig. 23. Gráficas del peso molecular de las fracciones eluidas de cloruro de cesio. (A) Gráfica del peso molecular con los datos originales y (B) Peso molecular estimado de acuerdo a la ecuación  $y = 210.139 e^{-0.029 x}$ .

### 7.-Extracción de RNA:

El proceso de extracción se inició a partir de las fracciones eluidas. Con el producto se realizó hibridación en membranas de soporte sólido, mostrado en la Fig. 15 y se corrió en geles de agarosa. Las bandas observadas en las fracciones de las siguientes figuras, no fueron tan características como esperábamos. En el primer gel, se depositaron en los carriles 4  $\mu$ l de muestra. Algunas bandas alcanzaron

mayor área que otras (Fig. 24) por la diferente concentración de virus en las fracciones, pero en el carril 2 y 8 la concentración del RNA no fue la suficiente para observarse en el gel. En esta primer observación no se tenía la seguridad si se trataba de RNA o si este correspondía al VST. Por lo cual se realizó la hibridación.

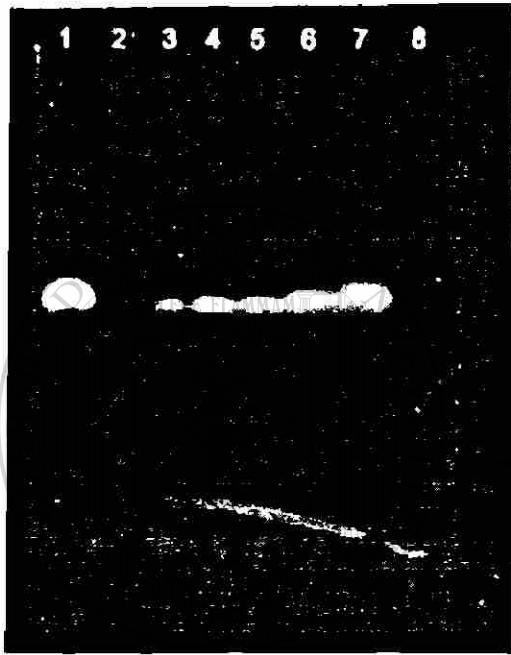


Fig. 24..Análisis del RNA obtenido de la fracciones eluidas en geles de agarosa. E volúmen depositado fue de 4 µl por cad carril. Las muestras originales correspondían los siguientes muestreos: 1-2: Fracciones d camarones cultivados en Sonora. 3 a 6 Fracciones de purificados virales de Sinaloa. a 8: Fracciones originanas de granjas d Nayant.

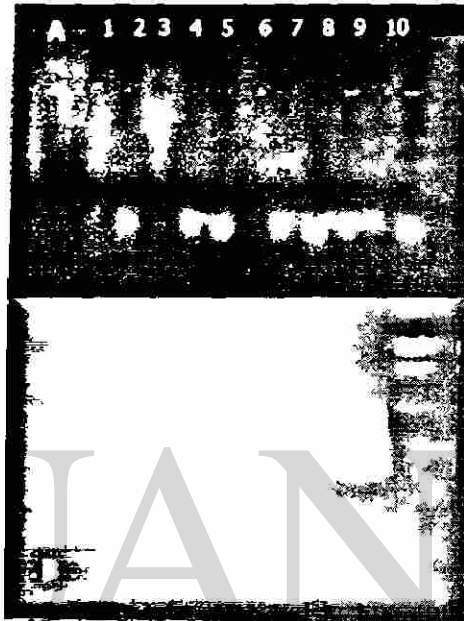


Fig. 25 A. Electroforesis realizada con el producto de extracciones correspondientes a los muestreos descritos en el texto. Fig. 25 B. Carril 1) Sin tratamiento. 2) Tratamiento con RNAasa. 3) Tratamiento con calor (100 °C) y 4) Tratamiento con DNAasa I. Las tres primeras corresponden a muestras de Nayarit, las siguientes cuatro a muestras de Sonora y las tres restantes a muestras de Sinaloa.

Para asegurar la presencia de RNA en el producto de la extracción, una muestra de 2 µl se trataron con DNAasa I, otros con RNAasa y la tercer muestra se calentó a 100 °C/3 min. La presencia de ácidos nucleicos persistió en la muestra tratada con DNAasa I, pero no se detectó en la muestra tratada con calor o RNAasa, con lo cual se concluyó que el producto de las extracciones son RNA de cadena sencilla (Fig. 25). Lo anterior, aunado a la reacción de hibridación descritos en la Fig. 15-19 indican que el RNA analizado es del virus causante del síndrome de Taura en las granjas camaronícolas de México.

subcutícula e intestino medio anterior (Fig. 29). La hipertrofia nuclear, observada en las células dañadas, fue más común en las fases tempranas de la enfermedad, o sea, donde estos se manifestaron como cuerpos eosinofílicos. Por el contrario, los cuerpos de inclusión basofílicos correspondieron a las fases tardías, observándose la cromatina marginal y atrofia nuclear.



Fig. 29. Cuerpos de inclusión Cowdry, tipo A, producto de la multiplicación viral en el interior de los núcleos de filamentos branquiales en la fase temprana de desarrollo (flecha).

El complejo de virus que causan el síndrome, se alojaron en células de origen endotelial y mesodérmico, como se describió originalmente en brotes de Asia. En tejido conectivo adyacente a las glándulas antenales presentaron cuerpos de inclusión eosinofílicos (Fig. 30) en menor grado de infección, en comparación a los filamentos branquiales. Además de los cuerpos de inclusión se detectó necrosis masiva en epitelio cuticular y branquias, observándose la cariorexis y picnosis nuclear. En estos casos, el desarrollo de cuerpos de inclusión basofílicos, con la cromatina marginal fue la más frecuente.

Fig. 30. Tejido conectivo adyacente a las glándulas antenales con cuerpos de inclusión Cowdry.

## II. CARACTERIZACION DEL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA Y LA ENFERMEDAD QUE CAUSA

**1. Signos macroscópicos del causados por el WSSV:** En la granja denominada Acuícola Valdéz, se observaron algunos ejemplares con las manchas blancas características, descritas en casos de Asia e India desde 1992. Estas manchas, midiéndose en exocutículas desprendidas, presentaron un diámetro de 0.1 a 3 mm (Fig. 26A) las que se presentaban aisladas. También se encontraron grupos traslapados de manchas, midiendo estas 6-8 mm. En los organismos vivos no se aprecian bien por el escaso contraste de la exocutícula, solo las que están sobre el hepatopáncreas por el color oscuro de este (Fig. 26B). En la zona de Sinaloa se detectaron estanques de *L. vannamei*, con brotes leves de mortalidad, oscilando estos entre el 2 y 10 %. Los ejemplares examinados tenían un peso promedio de 8 g, mostrando expansión de cromatóforos, resultando en una apariencia de color rojo o rosa (Fig. 27).



Fig. 26A. Manchas blancas en una exocutícula del cefalotorax de *L. vannamei*. 26B: En organismos vivos son casi inaparentes. Los ejemplares fueron detectados en Acuícola Valdéz, Guasave, Sin.

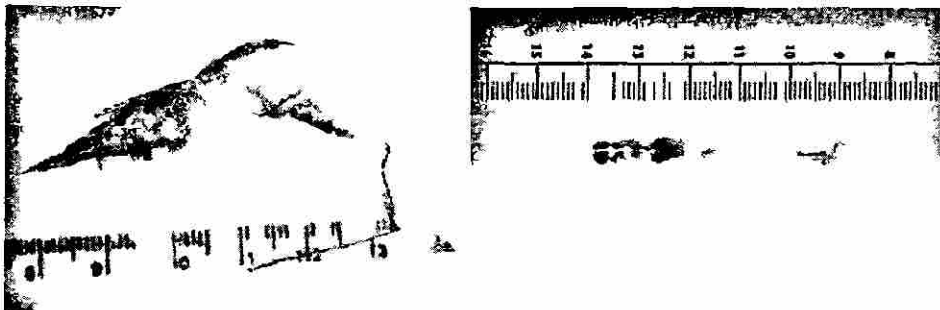


Foto 27 A y B. Ejemplares de *L. vannamei* con expansión de cromatóforos (camarón rojo o rosa), una de las expresiones clínicas de la enfermedad conocida como mancha blanca.

En resultados de campo se encontraron signos indicativos de la enfermedad, más sin embargo, la tasa de mortalidad reportadas no coincidieron con las registradas normalmente en Tailandia, Japón, India y otras localidades asiáticas, siendo estas más bajas.

Es necesario señalar que la expansión de cromatóforos no es una característica patognómica del síndrome de la mancha blanca, porque este también se presenta en el síndrome de Taura. Por este motivo se continuó con los análisis histopatológicos, para buscar al microscopio cuerpos de inclusión intranucleares (WSSV) y cuerpos de inclusión citoplásmicos de 1 a 20  $\mu\text{m}$  (TSV), pues en las localidades señaladas en la Tabla 11, se observaron ejemplares (*L. vannamei*) con signos sugestivos de la fase tardía del síndrome de Taura, la cual consiste en necrosis cuticular extensiva, en cualquier parte del cuerpo o diseminada en todo el ejemplar (Fig. 28). Primero se describen la histopatología de WSSV y después del TSV.

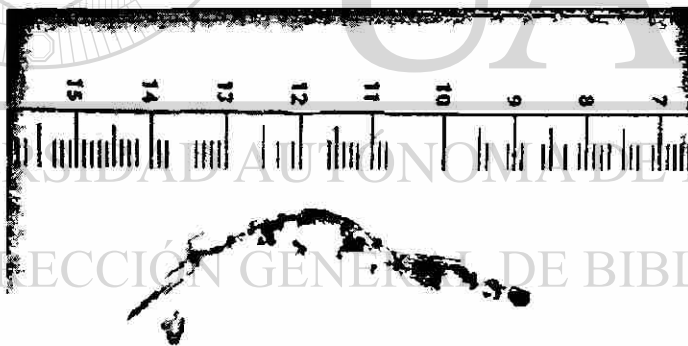


Fig. 28. Necrosis cuticular extensiva, sugestiva de una fase tardía del síndrome de Taura.

**2.- Histopatología de WSSV:** Los cortes histopatológicos, teñidos con hematoxilina y eosina, presentaron los cuerpos de inclusión Cowdry, Tipo A, eosinofílicos o basofílicos e intranucleares. Estos se observaron en los tejidos branquiales, tejido conectivo esponjoso, tejido muscular y tejido epitelial de la

Las granjas Thenari, Shrimp Quality, Acuavisión y Baturi , de Sinaloa, fueron las localidades donde se detectaron los cuerpos de inclusión señalados. En Sonora y Nayarit no se encontraron cuerpos de inclusión por microscopía de luz, o signos macroscópicos sugestivos de WSSV, debido quizá a que se cultivó una especie diferente, a excepción del Ejido Francisca Felix de Sonora, donde se observó una patología sugestiva (Tabla11).

**3.-Histopatología del virus del síndrome de Taura:** En la Tabla 11 se señalan las localidades donde se detectó la presencia histopatológica del síndrome de Taura, descrito en la primer etapa del estudio. En esta no se realizó el proceso de purificación, debido a que en la etapa anterior ya se tenía conocimiento de la presencia de este agente infeccioso en las localidades de estudio.

En las granjas camaronícolas de Sinaloa, en nueve de ellas se *encontraron L. vannamei* infectados con TSV correspondiendo a Thenari, Shrimp Quality, Acuavisión, Baturi, Acuícola Valdés, Juventud Pesquera, Coguasín y Manuel Avila Camacho. En Matanchen, Nayarit se detectó un brote epizootico con TSV. La fase crónica fue la que más predominó en la segunda etapa del estudio (Fig. 31), afectando severamente el órgano linfoide donde se apreció necrosis (cariorexis y picnosis) con cuerpos de inclusión esféricos basofílicos.

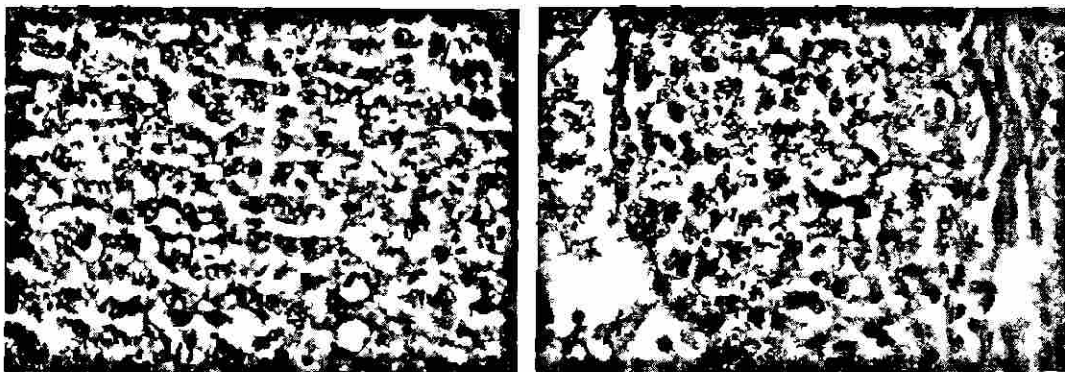


Fig. 31. Lesiones histopatológicas del virus de Taura. (A) Cariorexis extensiva, (B): Cuerpos de inclusión esféricos, citoplásmicos, característicos del TSV acompañados de necrosis severa en *L. vannamei* de Matanchen, Nayarit y otras localidades de Sinaloa señaladas en el texto.



Tabla 11. Resultados del examen histopatológico para detección del VST y WSSV.

ORIGEN	GRANJA	ESPECIE	VST	WSSSV
Sinaloa	Granja el Thenari	<i>L. vannamei</i>	+	+
		Jaiba silvestre ( <i>Callinectes</i> sp)	-	-
Sinaloa	Granja Shrimp Quality	<i>L. vannamei</i>	+	+
Sinaloa	Granja Acuavisión,	<i>L. vannamei</i>	+	+
Sinaloa	Granja El Baturi	<i>L. vannamei</i>	+	+
Sinaloa	Acuícola Valdés	<i>L. vannamei</i>	+	-
Sinaloa	Explotación Acuícola	<i>L. vannamei</i>	-	-
Sinaloa	Juventud Pesquera	<i>L. vannamei</i>	+	-
Sinaloa	Granja Coguasín	<i>L. vannamei</i>	+	-
Sinaloa	S.C. y P, A. Mayocoba	<i>L. vannamei</i>	-	-
Sinaloa	Manuel Avila Camacho	<i>L. s. vannamei</i>	+	-
Sinaloa	Acuícola Baja Mar	<i>L. vannamei</i>	+	-
Sinaloa	Las Isabeles	<i>L. vannamei</i>	-	-
Sonora	Ejido Francisca Felix.	<i>L. stylirostris</i>	+	±
Sonora	Jorge Díaz Serrano	<i>L. stylirostris</i>	+	-
Sonora	Héroes del Campo #2	<i>L. stylirostris</i>	-	-
Sonora	Comuneros Mayos	<i>L. stylirostris</i>	+	-
Sonora	Estero Aquirupo	<i>L. stylirostris</i> (silvestre)	-	-
Nayarit	Matanchen, Nayarit	<i>L. vannamei</i>	+	-

En la Tabla 11, se enlistan las localidades donde se observaron ejemplares con TSV en Sonora y Nayarit, los cuales, también en su mayoría, exhibieron la fase crónica del síndrome, también llamada de recuperación. Estas fueron la granja Francisca Felix, Jorge Díaz Serrano y Comuneros Mayos, pertenecientes a Sonora. En Nayarit solo se detectaron casos de TSV en Matanchen.

Cabe mencionar que al comparar los resultados de Sonora y Sinaloa, la mitad de las infecciones que se encontraron en esta segunda etapa eran mixtas, es decir, los casos de TSV eran simultáneos a los de WSSV en los ejemplares provenientes del mismo estanque y granja. Por ello, las bajas mortalidades descritas anteriormente podrían ser causadas por uno u otro virus, o ambos.

#### 4.- Reacción en cadena de la polimerasa.

**A.- Calidad del DNA purificado con DNAzol:** Los primers denominados 18 S, amplificaron fragmentos de 848 pb, correspondientes a la región nucleotídica 352 a 1200 de la subunidad 18 S rRNA, altamente conservada en decápodos. La Fig. 29 muestra las bandas observadas en los geles de agarosa, a partir de extracciones de DNA de las localidades estudiadas y amplificadas con los primers 143 F y 143 R.



Fig. 32. Amplificación por PCR del gen 18 S en muestras de camarón. Carril a y h) DNA ladder 100, marcador de pares de bases. b-c) Ejemplares de Sonora. d-e) Ejemplares de Sinaloa y f-g) Ejemplares de Nayarit. Gel de agarosa 1 % en TAE 1X mostrando los productos de amplificación.

De esta forma, se logró determinar si los resultados negativos eran reales, o correspondían a un DNA con elevado contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos u otros contaminantes que inhibieran el procedimiento de amplificación.

**B.- PCR simple o en un paso:** El primer F001 y R002, que amplifican productos de 306 pares de bases, fueron los que presentaron mayor eficiencia en los procedimientos de la reacción en cadena de la polimerasa, según se deduce de los resultados de la estandarización preliminar realizada con el DNA viral utilizado como control positivo. Estos amplificaron el producto esperado de 306 pb de las muestras de DNA purificadas de ejemplares cultivados en la granja Shrimp Quality, Thenari (enviados vivos o en preservados en hielo) y en especímenes enviados en etanol 96 % procedentes de Aquavisión. En todas estas se cultiva el camarón

blanco. El control positivo se observó como una banda compacta, perfectamente definida en la posición 306, utilizando el marcador DNA ladder 100, el cual presenta bandas cada 100 pb hasta 1500, y una superior de 2072. En la Fig. 30 se observa el gel de agarosa de los productos de la reacción, teñidos con bromuro de etidio.

Fig 33. Identificación de WSSV por PCR en muestra de camarón. Carril a) Control Positivo, b-d) ejemplares de Shrimp Quality; f-g) camarón blanco d Thenari preservado en hielo y transportado vivo respectivamente, h) ejemplares de Aquavisión, i marcador de pares de bases Ladder 100.

En los canales de llamada y el estero que alimenta a los estanques de la granja Thenari, se encontraron jaibas, las cuales al ser procesadas, fueron positivas a

la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca (carril e y h de la Fig. 33). Una muestra de *L vannamei*, cultivado en Baturi también resultó positiva al amplificarse con los mismos iniciadores F001 y R002.

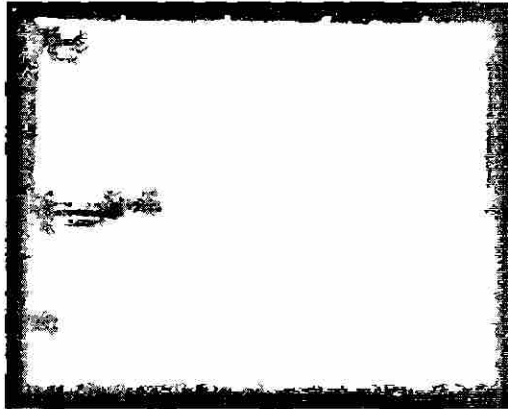
Las jaibas del entorno silvestre que presentaron productos amplificados, fueron identificadas como *Callinectes* sp.

Fig 34.: Identificación de WSSV por PCR e muestras de camarón y jaiba. Carril a) Control positivo; b) Jaiba silvestre del reservorio de Thenari; c y d): *L. vannamei* cultivado en Baturi; e) Jaiba silvestre *Callinectes* sp. de esteros de Thenari; f- g): *L. stylirostris* silvestre colectado e el reservorio de Baturi; h-i): *C.allinectes* sp silvestre; j) Marcador de pares de bases del DN Ladder 100.

a b c d e f g h i j  
Los iniciadores F001 y R002 amplificaron genomas virales de WSSV a partir del DNA total purificado de *Callinectes* sp. colectado en Thenari (carril c, Fig. 35,

nueva muestra), *L. vannamei* de la granja Coguasín (carril d) y Manuel Avila Camacho (carril e), preservados en etanol 96 %. El producto amplificado

Fig. 35. Identificación de WSSV por PCR en muestras de camarón *L. vannamei* y jaibas de Sinaloa. Carril a) Marcador de pares de bases DNA ladder 100, b) Control positivo. c) *Callinectes* sp. silvestre de Thenan. d) *L. vannamei* de Coguasín, e) la misma especie cultivada en Manuel Avila Camacho. f-g) Las Isabeles. h) Control Negativo. Gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5 X, teñido con bromuro de etidio.



correspondió a 306 pb, establecidas por su posición con respecto al marcador de pares de bases DNA ladder 100 (Fig. 32). En esta ocasión, las muestras se corrieron con peine de 0.8 mm de espesor, también en geles teñidos con bromuro de etidio. La localidad donde no se obtuvo producto amplificado fue en la granja Las Isabeles (carriles f y g, de la Fig. 35), procesándose dos muestras de la misma área.

**C.- PCR en dos pasos y multiplex:** En la estandarización de esta técnica el primer PCR se realizó con los iniciadores F001/R002 (amplifican productos de 306 pb), 146 F1/146 R1 (1447 pb), 6581/7632; RVP1; 1F/1R (365 pb). En el segundo PCR se adicionaron los primers internos del producto de 1447 (146 F2/146 R2); (941 pb) y 146 F4/146R3 (775 pb). La estandarización se realizó con genomas virales de variedades o cepas tailandesas, hondureñas y muestras positivas de México descritas en la páginas anteriores.

El gel que se muestra en la Fig. 36, muestra los amplicones que se resolvieron en la cepa tailandesa, situándose en las posiciones esperadas de 1447 pb; 941 pb y 775 pb, amplificado por los iniciadores F1/146 R1; 146 F2/146 R2 y

146 F4/146F3, respectivamente. También se muestran los productos de amplificación de los primers 1F y 1R y F001/ROO2 (306 y 365 pb).

En la cepa hondureña del virus de la mancha blanca, se apreciaron productos de 306 y 365 pb, obtenidos por la técnica de PCR múltiple o multiplex y productos de 775 pares de bases. Los productos de 1447 y 941 no se amplificaron en esta cepa.

En dos de las cepas o variedades mexicanas del virus del síndrome de la mancha blanca, correspondientes a el DNA extraído de las jaibas, *Callinectes* sp. de Thenari Sinaloa y camarones de Coguasín, ubicado en el mismo estado, los iniciadores que amplificaron productos fueron F001/ROO2 y 1F/1R, apreciándose los productos amplificados en las posiciones de 306 y 365 pb.

Fig. 36. Identificación de WSSV por PCR multiplex. Controles tailandeses (carril b), hondureños (c-d) mexicanos (e-f). Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.



El resto de los iniciadores mencionados anteriormente no amplificaron los productos esperados, aún variando la concentración de iniciadores, enzima *Taq*, nucleótidos o bien, la temperatura de anillamiento o aumentando el número de ciclos en el termociclador.

Las muestras positivas de Sinaloa y Sonora (descritas arriba) se procesaron por el PCR múltiple y PCR en dos pasos, demostrando que los iniciadores F001/ROO2 y 1F/1R amplifican de manera constante al genoma viral detectada en las localidades

mencionadas. Con respecto a los demás iniciadores, solo en una muestra se observó una banda tenue, ubicada en la posición de 775 pb. También se observaron bandas constantes de 600 pb como un producto de PCR no específico, originado por la introducción de varios iniciadores en la reacción. La Fig. 37 muestra los resultados obtenidos con la técnica descrita.

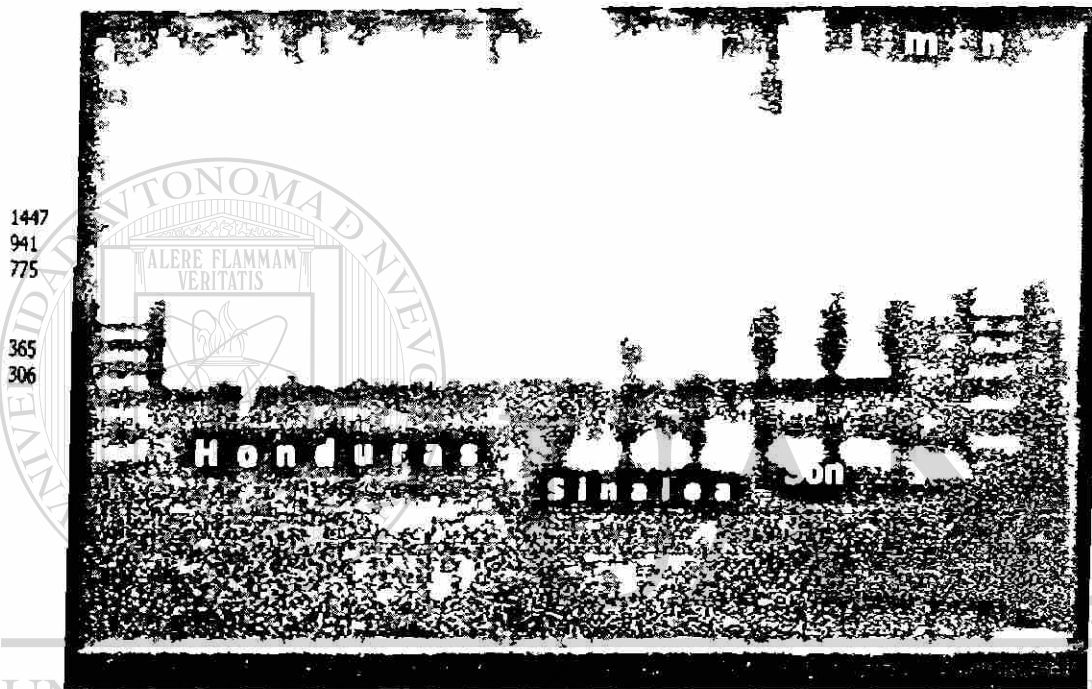


Fig. 37. PCR múltiple (multiplex) realizado en la modalidad de PCR en dos pasos, donde se observan los productos de la reacción con la cepa tailandesa como control (carril b); cepa hondureña (c-g); genoma viral detectado en Sinaloa (h-k); y de Sonora (l). En el carril m) se observa el control negativo y en los carriles a) y n) el marcador de pares de bases DNA Lader 100.

Con el DNA purificado a partir de la cepa tailandesa se observaron las bandas de 1447 pb, 941 pb, 775 pb, 365 pb y 306 pb al realizar la amplificación con el juego de iniciadores descritos. El resto de los iniciadores no amplificaron los productos esperados. El DNA obtenido de camarones originarios de una epizootia hondureña, al procesarse con los mismos primers, se observaron productos de 775 pb, 365 pb y 306 pb. A diferencia de la cepa tailandesa, no se observaron productos de 1447 y 941 pb.



Con el DNA purificado de los brotes epizooticos de Sinaloa, se observaron productos de 365 y 306 pb. Para el resto de los iniciadores no se obtuvieron productos de PCR. Las muestras de Sinaloa correspondieron a las localidades de Thenari, Manuel Avila Camacho, Coguasín (banda tenue de 775) y *Callinectes* sp. del canal de llamada de Thenari (carriles h-k, Fig. 37). En el carril restante se encontró un producto amplificado que corresponde a DNA purificado de camarón *L. stylirostris*, asintomático, correspondiente a la granja Francisca Felix, en el estero Siari, Sonora (carril l, Fig. 37).

La muestra de postlarvas enviada para análisis de Ensenada de Los Cocos, Bahía de Matanchén, frente a San Blas, Nayarit, se encontró positiva para la presencia del genoma viral. La diferencia de los amplicones o productos de PCR encontrados en la muestra, fue que uno de los productos de PCR, ubicados para la cepa tailandesa y hondureña se reveló en el gel de agarosa, por lo cual consideramos que esta corresponde a otra cepa diferente de virus de WSSV presente en el país.

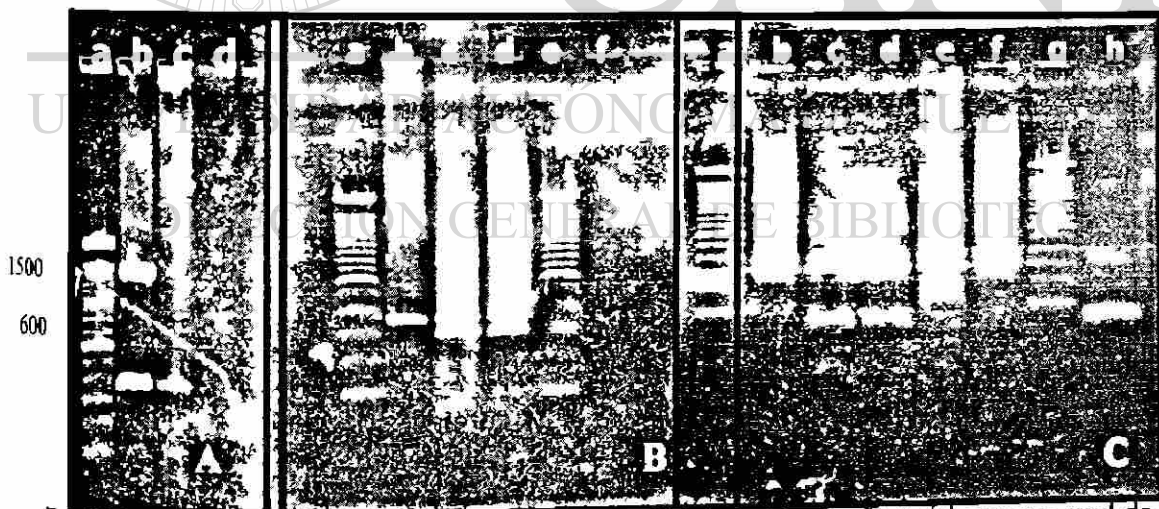


Fig. 38. Comparación de los amplicones de la cepa tailandesa, hondureña y del genoma viral de la cepa mexicana detectada en Ensenada de Los Cocos, Bahía de Matanchén. (A) Primer PCR del control tailandes (b); c) muestra de las postlarvas *L. vannamei* de Ensenada de Los Cocos; d) control negativo. (B) El producto del primer PCR del control tailandes se muestra en el carril b); en el carril c) aparece el producto del segundo PCR de la muestra de Ensenada de Los Cocos y en d) el producto del segundo PCR del control tailandes. En a) y e) se colocó el marcador DNA ladder 100 y en el carril f) el control negativo. (C) En el carril a) y g) se muestra el marcador DNA Lader 100;

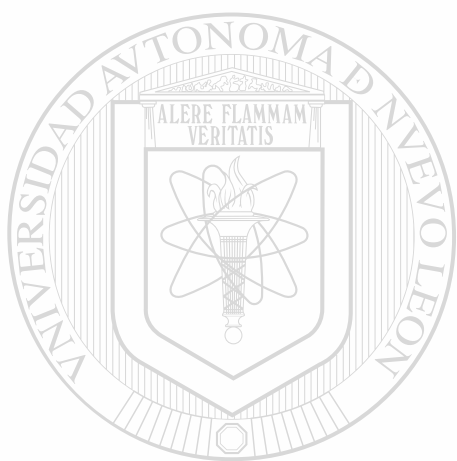
b y f) producto del segundo PCR del control tailandes, c) y d) segundo PCR de la cepa hondureña; e) producto del segundo PCR del genoma viral detectado en Bahia de Los Cocos; h) control negativo. Geles de agarosa al 1% en TAE 1 X teñidos con bromuro de etidio y electroforados a 50 mA. (Ver pesos moleculares en las figuras anteriores).

En la Fig. 38 A, se muestra el primer PCR de la muestra de Bahia de Cocos, San Blas Nayarit y el segundo PCR con los iniciadores internos del fragmento de 1447 pb. Al analizar los amplicones finales del PCR en dos pasos, encontramos una particularidad importante, evidenciada por una banda de 775 pb (Fig. 38 B) que solo se había observado en la cepa hondureña y la cual no se presentó en las muestras de Sinaloa y Sonora. La comparación entre las cepas de referencia y la segunda variedad del genoma viral, presente en el país, se corroboró en la segunda reacción realizada (38 C). En esta, encontramos que la cepa tailandesa seguía presentando amplicones de 1447, 941, 775, 365 y 306 (carril b y f). En la cepa hondureña (Fig. 38 C, carriles c y d) se presentaron los amplicones de 775, 365 y 306 pb (junto con el producto extra de 600 pb que acompañó las reacciones del sistema multiplex), mientras que en la muestra de postlarvas se encontraron los amplicones señalados en las mismas posiciones que la cepa hondureña (Fig. 38 C, carril e).

Al observar estos resultados, primero se sospecho de la contaminación de las muestras en el proceso de extracción del DNA, por lo cual se reinició el análisis de las muestras con tejido diferente, proveniente del congelador. Sin embargo, los resultados fueron iguales a los señalados en la Fig 38 A-C, encontrando también, el mismo comportamiento correcto de los controles negativos utilizados.

**D.- PCR en dos pasos con los ejemplares del primer muestreo:** Los AN extraídos de los ejemplares colectados en los sitios del primer muestreo durante 1996-1997 y conservados en el congelador arrojaron resultados negativos para la presencia del genoma viral del WSSV. La totalidad de las muestras fueron

p procesadas por triplicado y analizadas con la misma técnica de PCR descrita, pero  
e en los geles no se detectaron productos amplificados de WSSV.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

En el ámbito mundial, la camaronicultura actual es el reflejo de una práctica sostenida desde la década de los 70's. Paralelo al desarrollo de la industria del cultivo del camarón, también se han desarrollado problemas sanitarios, particularmente infecciones virales, las cuales han impactado en forma negativa la producción. De un solo virus (BP) que se conocía, afectando el cultivo de camarón en 1974 (Couch, 1974), actualmente se han descrito más de 20 anomalías atribuidas a virus, entre las cuales los más severos para la industria a nivel mundial, han sido el STV, WSSV y YHV (Lightner y cols., 1997; OIE, 1999).

En México, el cultivo del camarón como actividad comercial, se institucionalizó alrededor de 1977, desde entonces, ha ido creciendo paulatinamente para llegar a ser hoy en día una fuente permanente de empleos y generación de divisas para gran parte de la población ubicada principalmente en las zonas costeras del Pacífico Mexicano (Garmendia Nuñez, 1996).

---

Los resultados derivados de este estudio, al caracterizar al virus plenamente, comprueban que fue este la causa, y no la NEC (necrosis del epitelio cuticular) el que invadió a 40 de las 90 granjas camaroneras que operaron en Nayarit (PIINIAR, 1996), afectando el 50 % de la producción en ese estado (500 ton de las mil que se esperaban cosechar. A escala mundial, el Commerce Department's National Oceanic and Atmospheric Administration, estima en 9 billones de dólares, las pérdidas ocasionadas por enfermedades virales. A pesar de ello, en los países afectados no se han implementado programas de prevención y control, a excepción de Belice, donde se estableció un programa de erradicación que inició con la desinfección de estanques al finalizar el ciclo de cultivo, rotación de la tierra, dispersión de insecticidas, eliminación de carcasas y residuos en las plantas

procesadoras con excelentes resultados. Los programas de prevención y control, evitaron en Belice un impacto negativo erradicando al virus de las granjas (Dixon & Dorado, 1997).

La diseminación actual del TSV en el Continente Americano, es prácticamente cualquier sitio donde se cultiva camarón, con escasas excepciones, como son Jamaica, Puerto Rico y Venezuela, los cuales no se citan en la literatura (Hasson y cols., 1999).

En 1995, Lightner y cols. estudian muestras de *L. vannamei* cultivadas en Ecuador, Perú y Colombia, los cuales presentaban la fase pre aguda y crónica del TSV. El resultado histopatológico indicó áreas multifocales de necrosis en epitelio subcuticular de la superficie general del cuerpo, apéndices, branquias, intestino posterior, esófago y estómago. El tejido conectivo subcuticular y fibras de músculo estriado adyacente, también se encontró infectado. En las lesiones multifocales encuentran los conspicuos cuerpos de inclusión, citoplásmicos, esféricos (1-20 mm de diámetro) eosinofílicos, grisáceos o basofílicos más la presencia de núcleos picnóticos y cariorécticos. Al microscopio electrónico de transmisión observan cristales en forma de aguja en branquias, subcutícula y fibras musculares, las cuales identifican como cristales de fosfato de calcio, pero las partículas virales no las detectan en los cortes ultrafinos que realizaron, por lo cual estos investigadores se inclinan por un agente tóxico como la causa de la enfermedad. A diferencia de ellos, en este estudio, las partículas virales y los cristales de fosfato de calcio se observaron en el mismo campo en las observaciones efectuadas en 1996, con lo cual se tuvo la primer evidencia de la causa de las epizootias. Sin embargo, el estudio debía de continuar con la purificación por ultracentrifugación e inoculación de las fracciones eluidas en camarones sanos para la reproducción del cuadro clínico e histopatológico de la enfermedad. La coloración rojiza en los uropodos,

telson, pleópodos, pereopodos y antenas, corresponde a la expansión de los cromatóforos citada por Lightner y cols., en 1995. Estos investigadores revelan que en especímenes con estos signos se presenta una necrosis focal del epitelio, en los bordes de los apéndices. Esto marca una fase preaguda de la enfermedad, tal como se percibió en los ejemplares muertos en el bioensayo. Hasson y cols (1995) logran caracterizar el agente etiológico mediante estos procedimientos de muestras de camarones originarias de Ecuador y Hawaii. Los virus purificados median de 26 a 34 nm en las fracciones de muestras de Hawaii y de 24 a 34 en las de Ecuador. Los bioensayos les permitieron reproducir la fase preaguda y la crónica, encontrándose lesiones en órgano linfóide, similares a las que se describen en este estudio. La densidad flotante de las partículas según los resultados de Hasson y cols. (1995) fue de  $1.337 \text{ g ml}^{-1}$ , y en comparación a la realizada en el material procedente de Sonora, Sinaloa y Nayarit, que fue de 1.31 a  $1.34 \text{ g cm}^{-3}$  (índice de refracción de 1.363, 1.364, 1.367 y 1.365), permite definir al agente causal como el mismo virus descrito por ellos, aunque las medidas realizadas al microscopio electrónico nos permiten establecer un diámetro de 31-32 nm.

En los bioensayos del experimento observamos supervivencia del 50% hasta el octavo dpi, difiriendo notablemente de los resultados de Hasson y cols. (1995) quienes observan sobrevivencias cercanas al 13 y al 17 % en solo 4-5 dpi. Otra de las diferencias observadas es que el pico de mortalidad fue del 73 al 87%, presentándose este entre el tercer y cuarto día que duró el bioensayo.

Los inóculos empleados fueron tomados de las bandas de los gradientes de sucrosa y CsCl, a diferencia del procedimiento empleado por Hasson y cols.(1995) quienes emplean en uno de los bioensayos un inóculo crudo, homogeneizando y centrifugando a 30,000 rpm.



Suponemos que esta diferencia se debe al origen de la cepa de virus, pues ellos emplean una cepa ecuatoriana de *L. vannamei* infectada, inoculándola en organismos SPF de la misma especie. En este bioensayo, los camarones no provenían de laboratorios, sino que eran camarones silvestres por lo cual no presentaron tanta sensibilidad al virus como la observada por los autores mencionados, o bien, por la concentración de los virus en el inóculo.

Bonami y cols. en 1997, describen también sus resultados con respecto a la caracterización del agente viral del síndrome de Taura a partir de muestras ecuatorianas y Hawaianas. Encuentran partículas icosaédricas de 31 a 32 nm de diámetro, las cuales concuerdan con las medidas realizadas en las observaciones de las fracciones eluidas de muestras de camarones de Sinaloa, Sonora y Nayarit realizadas en este estudio. La densidad flotante calculada por los autores en la caracterización del síndrome en muestras ecuatorianas y hawaianas fue de  $1.338 \pm 0.001$  g/ml, difiriendo ligeramente de las lecturas encontradas en los virus purificados procedentes de muestras del Pacífico mexicano ( $\rho = 1.31$  a  $1.34$  g cm<sup>3</sup>). Hasson y cols (1995) consideran que el TSV debe ubicarse en la familia Picomaviridae o Nodaviridae, mientras que Bonami y cols. (1997) lo ubican en Picomaviridae. De acuerdo a nuestras referencias bibliográficas, Picomaviridae presenta un diámetro de 24-30 nm con una densidad de 1.33 a 1.45 g/cm<sup>3</sup>; en cambio, Nodaviridae mide 29-30 nm y su densidad oscila de 1.30 a 1.35 g/cm<sup>3</sup> (Trudel & Payment, 1993), por ello, nos inclinamos a respaldar la sugerencia de ubicarlo en los Nodaviridae. Bonami y cols. (1997) con la reacción de orcinol demuestra que el genoma del virus está constituido por RNA, mientras que la reacción de la difenilamina permaneció negativa. El análisis en geles de agarosa al 1 % en condiciones desnaturizantes determina una longitud de 9 kb comparada con marcadores de ss RNA y fue sensitivo a la digestión con MBN y RNasa A, pero resistente a la digestión con DNasa. Resultados similares encontramos en los



resultados descritos al realizar las digestiones con DNasa I y RNasa en el genoma extraído con Trizol. Los picos de mortalidad acumulativa obtenida en los bioensayos ascendieron al 60 % con el grupo inoculado con los virus de Hawaii y 64 % en el grupo ecuatoriano, extendiéndose a siete días los experimentos de bioinfectividad.

El análisis de proteínas en los geles de poliacrilamida entre el estudio de Bonami y cols (1997) y el descrito aquí fue la diferencia mayor encontrada. Estos investigadores determinan la presencia de tres polipéptidos mayores de 24, 40 y 55 kD y un polipéptido menor de 58 kD En los geles realizados en las fracciones eluidas, encontramos en cambio, cuatro polipéptidos mayores, de 154, 124, 72 y 56.9 kD y dos menores, de 54 y 38 kD.

En 1997, Hasson y cols. estudian la distribución geográfica del TSV en el Continente Americano por histopatología e hibridación *in situ*. Analizan 98 muestras de las cuales, 74 (76 %) fueron positivas a la sonda, encontrando la reacción en las células subcuticulares y en órgano linfoide, donde al parecer, el TSV es secuestrado durante la fase crónica de la infección. Veinticuatro de las muestras no reaccionaron con la sonda de hibridación, debido a la hidrólisis ácida causada por el fijador Davidson que tenía un pH de 3.5 a 4.0. Solucionan este problema utilizando un fijador neutro (pH 6-7), llamándolo "RNA-friendly" (RF). Las muestras analizadas fueron colectadas desde Brasil hasta South Carolina y Texas, USA en el periodo comprendido de 1991-1996. También en 1999, Hasson y cols. reportan la presencia del TSV en muestras de Guayas, Ecuador (1992); Tumaco, Colombia y Tumbes, Perú (1993); Pernambuco, Brasil; Colombia; Ecuador; El Salvador; Guatemala; Honduras; Ohau, Hawaii y Florida, EUA. En muestreos de 1995 lo detectan en Belice, Ecuador, Salvador, Honduras, México (Sonora, Sinaloa, Guerrero, Chiapas); Nicaragua, Panamá y Texas, EUA. En los muestreos de 1996 lo

ubican en Belice, Costa Rica, Guatemala, México (Sonora, Sinaloa y Tamaulipas), Panamá y EUA (Texas) por ensayos de hibridación e histopatología. Estos encuentros apoyan fuertemente la distribución geográfica del TSV, indicando que el mismo virus o cepas estrechamente relacionadas son las responsables de las epizootias que han ocurrido en el Continente Americano desde 1992. Así mismo, indica que el TSV es responsable de muchas, si no todas, las epizootias de México y Texas durante 1995 y que estas epizootias no fueron el resultado de "la enfermedad similar al síndrome de Taura", citando a Jiménez (1996) o bacterias intracelulares, pues la existencia de estas dos enfermedades aún no ha sido científicamente establecido y documentado. Bajo esta perspectiva, concordamos completamente con Hasson y cols. (1999), al encontrar las partículas virales, confirmando los resultados mediante observaciones al microscopio electrónico, pases sucesivos en bioensayos, histopatología e hibridación, inclusive, el análisis del genoma viral. De hecho, los resultados de este manuscrito indican la existencia de brotes en el presente ciclo de cultivo (Octubre de 1999) causados por el mismo TSV en granjas localizadas en Nayarit y Sinaloa, principalmente, pero no tan severos como los que causó en 1996-1998.

Hasta 1999, la enfermedad más importante en la industria camaronícola del Continente Americano es, sin lugar a dudas, el síndrome de Taura. Lotz (1997) estudia el efecto del tamaño del hospedero (*L. vannamei*) con respecto a la virulencia del TSV, como una táctica para disminuir el efecto adverso de las infecciones en los cultivos. En los experimentos efectuados observa que el hospedero no aumenta su tolerancia al virus al aumentar su talla de 1 a 30 g.

Hasta la fecha en que concluyó la segunda etapa, las mortalidades por el TSV en el Continente Americano no han concluido, aunque si podemos asegurar que el impacto es menor, debido probablemente a la mayor resistencia al patógeno,

generada por el camarón, pero también a que la práctica de cultivar postlarvas silvestres ha disminuido dramáticamente, cultivándose por lo general, larvas certificadas producidas en laboratorios bajo condiciones sanitarias controladas, libres del virus de Taura.

Aunque Hasson y cols. indican en sus reportes de 1995 la identificación del agente etiológico del síndrome de Taura, en camaronicultivos de Ecuador y Hawaii, así como Bonami y cols., en 1997 (a partir de muestras de camarón de los mismos países mencionados), consideramos conveniente continuar con este estudio, iniciado en 1996, al no conocer, en las granjas de México, el agente de las epizootias de la enfermedad a la cual se le llamaba "síndrome del camarón rojizo" o también, NEC (necrosis del epitelio cuticular), pues este cuadro clínico también es causado por bacterias del género *Vibrio*, sustancias tóxicas (pesticidas), florecimiento de algas tóxicas, toxinas cianobacterianas o bacterias intracelulares (Brock y cols., 1994).

Con respecto a la segunda etapa de estudio, desarrollada en el primer semestre de 1999, este se inició al tener conocimiento de la presencia de camarones de color rojo o rosa en la estanquería de las granjas ubicadas en Los Mochis, Sinaloa, aunado a mortalidades significativas que solo afectaban a *L. vannamei*, más no en estanquería vecina donde se cultivaba a *L. stylirostris*. Inicialmente se sospecho de la fase aguda del síndrome de Taura. Cabe aclarar, que en los ciclos de cultivo de 1998 no se presenciaron brotes epizooticos similares a los que causa el síndrome de Taura y se consideraba esta enfermedad como un suceso pasado. Al iniciar los muestreos de material biológico en Los Mochis, Guasave y Culiacán, detectamos algunos ejemplares con las "manchas blancas", pero otros, presentaban también necrosis generalizada en la exocutícula.

Los resultados indicaron la presencia de WSSV, confirmándose por la reacción en cadena de la polimerasa la identificación preliminar realizada por la apariencia macroscópica de las manchas blancas en campo y los cuerpos de inclusión intranucleares Cowdry, tipo A en el estudio histopatológico.

Los resultados del cuadro clínico, histopatología y reacción en cadena de la polimerasa coincidieron en cinco de los sitios de muestreo, siendo estos la granja Thenari (camarón cultivado y jaibas silvestres *Callinectes* sp.), Shrimp Quality, Acuavisión, Baturi. La muestra de la granja Manuel Avila Camacho, *L. stylirostris* procedente de Sonora y la de Bahía de Matanchen se diagnosticaron positivas por PCR. La presencia de este virus en México no es tan sorprendente si tomamos en cuenta los casos de Nicaragua y Honduras (Lara, 1999) ocurridos en el Golfo de Fonseca, afectando principalmente a *L. stylirostris* de origen silvestre. Este fue el primer reporte de la presencia del WSSV en las costas del Pacífico del Continente Americano, porque los primeros tres casos diagnosticados sucedieron en Texas, Carolina del Sur y en el Zoológico Nacional de Washington. EUA durante 1995. En las dos primeras epizootias se reportaron pérdidas en los cultivos de *L. setiferus* y en la tercera a los cangrejos de río *Procambarus* spp. y *Orconectes punctimanus* (Nunan y Lightner, 1997). Las infecciones experimentales de un aislado tailandés, realizadas por Lightner y cols. (1998) en especies americanas de camarones indicaron también, infecciones de curso severo en *L. setiferus* y *L. vannemei*, con mortalidades acumulativas del 100 %, aunque en *Fa aztecus* y *Fa duorarum* mostraron cursos moderados y resistencia a la infección, respectivamente.

La presencia del virus del síndrome de la mancha blanca es una pregunta difícil de responder, aunque existe una evidencia real predominante. Al estudiar productos alimenticios congelados, en supermercados de los Estados Unidos de Norteamérica (se importaron 119 millones de toneladas de crustáceos asiáticos)

representados por seis exportadores asiáticos, se encontraron infectados por WSSV y por el virus de la cabeza amarilla (este último causa serias epizootias en Asia) por las técnicas de PCR, hibridación y MET. Incluso, algunas de las muestras positivas, resultaron con virus infecciosos al probarse en bioensayos experimentales.

Aunque este estudio confirma la presencia del WSSV en el país, no nos atrevemos a asegurar que las mortalidades registradas corresponden a infecciones de este virus al encontrarse infecciones mixtas con TSV. La cepa o aislado geográfico que se encuentra en Sinaloa y Sonora amplifica de manera constante con los primers 1F/1R y FOO1/ROO2 que amplifican productos de 365 y 306 pb .

El primer par de primers fueron diseñados por Kim y cols. (1998) a partir de virus purificados de *P. japonicus* en Corea realizado por Kim y cols (1998). De acuerdo a los resultados de estos autores, obtiene cientos de clonas a partir del genoma viral de las fracciones purificadas. El análisis de las secuencias nucleotídicas mostró que ninguna de las clonas mostró considerable homología con las de otros virus conocidos. Indica que el virus nombrado como baculovirus asociado con el WSBV es un nuevo virus que causa enfermedad seria en camarones.

El segundo par de primers fue diseñado por Klimpel (1999, com. pers.) a partir de una cepa tailandesa que causa efectos desbastadores en peneidos.

En cambio, el aislado que se detectó en Nayarit, amplificó también con los primers descritos Lo y cols (1996) quien purificó las partículas virales a partir de *P. monodon* en Tailandia.

El comportamiento de ambos aislados geográficos o cepas, al amplificarse por PCR es diferente, por lo cual suponemos que ambos tienen diferente origen. Una alternativa que sugerimos es la introducción de crustáceos congelados al país, realizados por cadenas de restaurantes u hoteles, debido a que antes de 1999 no existían restricciones para la importación de estos productos. Los desechos del procesamiento como son el corte, procesamiento sanitario y reempacado de los productos definitivamente van al mar o se realizan en áreas cercanas a la costa, constituyendo una fuente de infección para los crustáceos silvestres o cultivados, tal como ha sido demostrado en Estados Unidos de Norteamérica (Lightner y cols., 1998). Otra de las alternativas es el arribo del camarón asiático, *P. monodon* a aguas mexicanas por mar, tal como ocurrió en el sistema lagunar costera Huizache-Camainero, Sinaloa, reportado en 1994 por Córdova Murueta y cols. Ambas alternativas constituyen serios objetivos que deberán analizarse en otros estudios.

La variabilidad en las secuencias nucleotídicas de los virus que constituyen al complejo WSSV ha obligado a los investigadores a purificar por ultracentrifugación las partículas virales de las entidades geográficas donde han ocurrido mortalidades en masa. Por esta razón existen diversos pares de primers para la detección del virus. Cabe mencionar que el protocolo de Lo y cols. (1996) es el que se utiliza más comúnmente para estandarizar los nuevos protocolos de la reacción en cadena de la polimerasa, aunque no siempre detectan la presencia del genoma viral, como ocurrió en los casos del país. Incluso, en la literatura se le denomina con diferentes nombres como son: Virus de la necrosis baculoviral hipodérmica y hematopoyética (IHNVB, Huang y cols., 1994); Virus en forma de varilla de *Penaeus japonicus* (RV-PJ, Inouye y cols., 1994; Takahashi y cols., 1994); Baculovirus mesodérmico y ectodérmico sistémico (SEMBV, Wongteerasupaya y cols., 1995) y Baculovirus de la mancha blanca (WSBV). Actualmente se le ha ha



llamado WSSV para uniformizar el complejo de virus con un solo nombre (Lightner, 1996), pero también porque en el 6° Reporte ICTV los Nudivaculovirinae y el género NOB (Non-Occluded Baculovirus, solicitado por Lo y cols., 1997) no se enlistaron, permaneciendo en la lista de virus de invertebrados sin asignación genérica (Murphy y cols., 1995).

La amplia diversidad de hospederos que presenta el WSSV incluyó inicialmente a especies de peneidos asiáticos, como *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *Marsupenaeus (P.) japonicus*, *Fenneropenaeus chinensis (P. orientalis)*, *Fe. Penicillatus*, *Fe indicus*, *Fe merguiensis*, *Trachypenaeus curvirostris* y *Metapenaeus ensis* (Wongteerasupaya, 1995; Lo y cols. 1996; Lightner y cols., 1997). En el Hemisferio Occidental el rango de hospederos incluye a *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris* con infecciones naturales y a *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *L. setiferus*, *Farfantepenaeus aztecus* y *Fa. duorarum* (Lightner y cols., 1997; Wang, 1999). Las diferencias entre los casos asiáticos y los del Continente Americano son que en Asia las manchas blancas del exoesqueleto son muy prominentes, alcanzando estas de 0.5 a 3 mm de diámetro; la coloración rosa o rojiza del cuerpo en casos avanzados de la infección, letargia, pérdida del exoesqueleto, disminución repentina en el consumo de alimento, afecta a juveniles de todas las edades, siendo más severo entre el primer y segundo mes de la siembra, las cepas inducen mortalidades del 80-100 % y son escasas las que ocasionan mortalidades menores al 20 %. A diferencia, en el Hemisferio Occidental las manchas blancas son difíciles de observar, aún en infecciones experimentales, por lo cual, la ausencia de estas no es una regla para excluir una infección, requiriéndose de la confirmación por métodos más sensitivos para un diagnóstico definitivo (Lightner y cols., 1997). En los casos revisados personalmente por el autor, de ejemplares provenientes de Nicaragua y Honduras, el material presentó manchas blancas diminutas en escasos ejemplares, difíciles de detectar a simple



vista (0.18 a 2 mm), solas o en aglomerados. El color rojizo del cuerpo fue similar a los casos causados por el TSV. La mortalidad en esta ocasión (Febrero-Marzo de 1999) alcanzó del 60-80 %. En los casos estudiados de las granjas mexicanas, los brotes de mortalidad fueron cortos y se sucedieron entre el primer y segundo mes de la siembra. Las mortalidades observadas por estanque fueron menores del 20 %.

Fue muy importante, en el desarrollo de la segunda etapa, revisar el manuscrito de Sudha y cols. (1998) porque diferencia tres tipos de epizootias asociadas al síndrome de la mancha blanca en *P. monodon* y *Fe indicus* cultivados en la India y que coinciden con los casos ocurridos en México. Menciona que es bien conocido que los signos clínicos son no específicos y por lo común, reflejan un imbalance funcional de los órganos blanco. Los signos dependen del tejido blanco de la infección, la carga de patógenos, severidad de la infección y respuesta del hospedero. Diferencia el tipo I de epizootias porque los camarones en cultivo presentan manchas blancas predominantes, las mortalidades significativas tienen un periodo de duración de 7-10 días en cultivos con 60-90 días promedio. Este tipo de epizootias se presentó en subadultos y abarcó al 60 % de las epizootias estudiadas. La forma de la enfermedad predominante fue la aguda. La epizootia tipo II la caracteriza porque los camarones presentan predominantemente el cuerpo rosa o rojizo. La duración de la mortalidad más significativa ocurrió en un periodo de 2-3 días afectando a camarones juveniles donde se manifestó la fase preaguda. El total de epizootias afectadas abarco al 10% de las estudiadas, en cultivos de menos de 30 días. En contraste, al tipo III lo separa de los dos primeros porque los camarones (subadultos) en cultivo están saludables, las mortalidades más significativas abarcan periodos de 60-90 días y la forma de enfermedad que se presenta es la crónica. El porcentaje de epizootias correspondió al 30 %, con respecto al total. Los casos registrados en México, de

acuerdo al punto de vista de Sudha y cols. (1998), quedarían ubicados en el tipo II por presentar los ejemplares el cuerpo rojizo o rosa y afectar a juveniles entre el primer y segundo mes de la siembra, según la información obtenida en mayoría de las granjas que se visitaron en Sinaloa y que resultaron positivas (Thenari, Acuavisión, Baturi). El caso detectado en Sonora por PCR ocurrió en ejemplares asintomáticos, sanos y en sitios donde no se presentaron brotes, en contraste a los casos observados en la misma especie de hospederos cultivados en Honduras y Nicaragua y a los resultados descritos por Lightner y cols. (1997) donde menciona que en *P. stylirostris* (al igual que en postlarvas y juveniles de *P. vannamei*, *P. setiferus*, *P. aztecus* y *P. duorarum*) al ser infectados experimentalmente desarrollaron la enfermedad con los inoculos del virus, debido probablemente por la diferencia en las cepas o aislados virales.

Wang y cols. (1999) estudia seis aislados geográficos por infecciones experimentales. Los aislados provenían de China, India, South Carolina, Texas y el Zoológico Nacional en Washington y amplifica la cantidad de virus inoculándolo primero en *L. setiferus* por inyección o en el alimento. El primer ensayo lo realiza en 700 postlarvas (PL 30) SPF de *L. vannamei* y el segundo en 75 *Fa duorarum* y 15 SPF de *L. vannamei*. La mortalidad acumulativa de *L. vannamei* alcanzó el 100 % después de retarlos con los seis aislados geográficos de WSSV. De los aislados, el de Texas causó mortalidades más rápido que el resto. El aislado viral de los langostinos fue el más bajo. El contraste más marcado se encontró en *Fa duorarum* donde se presentaron mortalidades del 35-60% y varió de un aislado a otro. Interesantemente, en esta especie, el aislado de Texas fue también el más virulento. De acuerdo al punto de vista de los autores, sugieren que existen diferencias en la virulencia de los aislados y que la susceptibilidad varía con la especie y estadio de vida del hospedero, con lo cual estamos de acuerdo al revisar los casos del país y compararla con los descritos en la literatura.

Es claro, desde nuestro punto de vista, que existen en el país dos cepas o aislados geográficos distintos, según lo señalan los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa. Uno de ellos ubicado en cultivos de Sinaloa y Sonora y el segundo en las costas de Matanchen. Este último aislado, al obtenerse de un lote de postlarvas silvestres, presentaron productos de PCR de los que describe Lo y cols. (1996) y que son similares a los que se observaron en los controles de Honduras, con bandas de 775, 306 y 365 pb: Estos lotes de postlarvas finalmente no se cultivaron (en respuesta a la norma oficial NOM-001-PESC-1999) por lo cual no tenemos datos de sobrevivencia o mortalidad acumulativa. En los casos de Honduras y Matanchen, los productos que no amplificaron en la reacción fueron el de 941 y 1447, pero que si amplifican regularmente en el control tailandés utilizado en las reacciones.

En Marzo del presente año, el gobierno mexicano a través de la SEMARNAP, emitió la norma NOM-EM-PESC-1999 con la cual, se restringen las importaciones de crustáceos e insumos para evitar la introducción de los virus mancha blanca y cabeza amarilla al país, debido a la mortalidad masiva ocurrida en Centroamérica a inicios de 1999 y a los casos registrados en los Estados Unidos de Norteamérica desde 1995. Por ello, el Centro Nacional de Sanidad Acuícola, es uno de los cuatro laboratorios aprobados por la SEMARNAP para analizar las muestras de las compañías importadoras de camarón para consumo humano, sementales para producción de larvas, postlarvas para cultivo e insumos alimenticios para los cultivos como es la *Artemia*. De hecho, a la actualidad, el Laboratorio de Patología Molecular del CNSA es el único con las instalaciones, equipo y personal capacitado donde se realiza la técnica de PCR en el país.

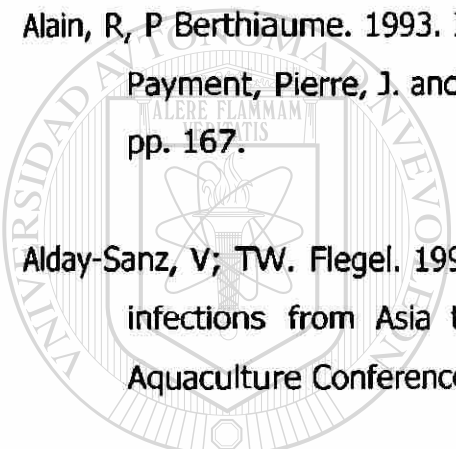
## LITERATURA CITADA

Adams, JR; JR Bonami. (Editors). 1991. Atlas of Invertebrate Virus. CRC Press, Boca Raton, FL. 684 pp.

Adams, JR; JT McClintock. 1991. Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses. Part 1. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. Pp.87-204 *in* Adams, JR and JR Bonami Editors. Atlas of invertebrate viruses, Chap VI. CRC Press, Boca Raton, FLA.

Alain, R, P Berthiaume. 1993. Immunocytochemical Staining in Electron Microscopy. *In:* Payment, Pierre, J. and M Trudel. Methods and Techniques in Virology. Chap 18. pp. 167.

Alday-Sanz, V; TW. Flegel. 1997. The risk of introducing yellowhead and whitespot viral infections from Asia to the Americas. *In:* Proceedings , Fourth Ecuadorian Aquaculture Conference, 22-27 October 1997, Guayaquil, Ecuador.

Anton, IA; DP. Lane. 1986. Non-structural protein 1 of parvoviruses: Homology to purine nucleotide using proteins and early proteins of papoviruses. Nucleic Acids Res. 14, 7813. 

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Asian Shrimp Culture Council 1994. SEMBV- an emerging viral threat to culture shrimp in Asia. Asian Shrimp News. 20, 2-3.

Boehringer Mannheim. Corporation. 1989. DNA Labeling and Detection Nonradioactive. Applications Manual, Biochemical Products. Biochemica: 1-62

Bonami, JR; B. Trumper, J Mari, M Brehelin, D V. Lightner. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. J of General Virology. 71:2657-2664.

Bonami, JR, DV. Lightner. 1991. Unclassified viruses of crustacea. Atlas of Invertebrates Viruses. Adams, JR. and JR Bonami (Eds). CRC Press, Inc. Pp. 597-622.

Bonami, JR; DV Lightner, RM Redman, BT Poulos. 1992. Partial characterization of a togavirus (LOWV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimps. Diseases of Aquatic Organisms. 14:145-152.

Bonami, JR; KW. Hasson, J Mary, BT Poulos, DV Lightner. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. J. of General Virology. 78: 313-139.

Boonyaratpalin, S; K. Supamattaya, S. Direkbusaracom, U. Aekpanithanpong, C. Chantanachooklin. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of Yellow Head Disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Gyobyo Kenkyu. 28: 103-109.

Boyd, C. 1994. Taura Syndrome Workshop: executive summary, January, 21-22, 1994. University of Arizona, Tucson, Arizona, USA. pp.148.

Brock, J.A; DV Lightner. 1990. Diseases of Crustacea. Diseases caused by microorganisms. . Vol 3, Pp 1-245 in O. Kinne, editor. Diseases of Marine Animals. John Wiley & Sons, New York, USA.

Brock, J; K Main. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute. Makapu Point, Honolulu, HI. 241 pp.

Brock, JA.; R Gose, DV Lightner, K Hasson. 1995. An Overview on Taura Syndrome, an Important Disease of Farmed *Penaeus vannamei*. Pp 84-94 in C.L. Brodway and J.S. Hopkins, editors. Swimming through troubled water, proceedings of the

- special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Bruce, LD. 1993. Application of recombinant techniques for detection of the penaeid shrimp baculovirus, BP. U.M.I. The University of Arizona Tesis. 1-111 pp.
- Caetano-Anollés, G; PM. Gresshoff. 1994. Staining nucleic acids with silver, an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes*. 45: 13-18.
- Cai, S; J Huang, C Wang, X Song, X Sun, J Yu, Y Zhang, C. Yang. 1995. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. *J. Fish. China*. 19: 112-117.
- Campbell, J and G Gerard. 1994. Proteinase K stability. *Focus*. 16: 1-22
- Chen, SN. 1995. Current state of shrimp aquaculture in Taiwan. Pp. 29-34 *in* C.L Brodway and JS Hopkins, editors. *Swimming through troubled water*. Proceedings of the special session on shrimp farming. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Córdova-Murueta, JH; MJ Acosta Ruíz, D. Voltolina. 1994. Primer registro de *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 en las costas de Sinaloa, México. *Rev. Inv. Cient. Ser. Cienc. Mar. UABC*. 5: 31-32.
- Couch, JA. 1974. An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: Ultrastructure, prevalence and enhancement. *J. Invertbr. Pathol.* 24, 311-331
- Couch, JA. 1981. Viral Diseases of invertebrates others than insects. Pp 127-160 *in* EW Davidson, editor. *Pathogenesis of invertebrates microbial diseases*. Allanheld, Osmum, Totowa, NJ, USA.

Dixon, H; J Dorado. 1997. Managing Taura syndrome virus in Belize: A case study. Aquaculture Magazine/June. 30-42.

Dumas, B; M Jourdan, AM Pascaud, M Bergoin. 1992. Complete nucleotide sequence of the cloned infectious genome of *Junonia coenia* Densovirus reveals an organization unique among Parvoviruses. Virology. 191: 202-222.

Durand, S; DV Lightner, LM Nunan, RM Redman, JC Mari, JR Bonami. 1996. Application of gene probes as diagnostic tool for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms. 27: 59-66.

Durand, S; DV. Lightner, R M Redman, JR Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). Diseases of Aquatic Organisms. 29:205-211.

Francki, RIB; CM Fauquet, DL Knudson, F Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Archives of Virology, Springer-Verlag, Viena, p 450.

Garmendia Nuñez, E. 1996. El Cultivo de camarón (Antecedentes y Situación Actual). Rev. Unión. Organo de Información y Consulta. Nov. 1996. Año 1. Nº 1: 14-16.

Giraud, C; G Devauchelle, M Bergoin. 1992. The Densovirus of *Junonia coenia* (Jc DNV) as an Insect Cell Expression Vector. Virology, 186: 207-218.

Glocker, B; R Richard, JR Hoopes, L Hodges, GF. Rohrmann. 1993. *In vitro* transcription from Baculovirus late gene promoters: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts prepared from infected *Spodoptera frugiperda* cells. Journal of Virology. 27:3771-3776.



Hasson, K.W.; DV Lightner, BT Poulos, RM Redman, BL White, JA Brock, J.R. Bonami. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23:115-126.

Hasson, KW; H Aubert, RM Redman, DV Lightner. 1996. A new RNA friendly fixative for the preservation of penaeid shrimps samples for virological assays using cDNA probes. *Journal of Virological Methods*. 66: 227-236.

Hasson, KW; DV Lightner, J Mari, JR Bonami. 1997. The geographic distribution of Taura syndrome virus in the Americas: determination by histopathology and *in situ* hybridization using TSV-Specific cDNA Probes. IV Simposio Centroamericano de Acuicultura. Honduras. pp. 154-155.

Hasson, KW; DV. Lightner, J Mari, JR Bonami, BPoulos, LL Mohny, R M Redman, J A Brock. 1999. The geographic distribution of Taura syndrome virus (TSV) in the Americas: determination by histopatology and in situ hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*. 171:13-26

---

Huang, J; XL Song, J Yu, CH Yang. 1994. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis - pathology of the shrimp explosive epidermic disease. Abstracts. Yellow Sea Fishery Research Institute, Qingdom, P.R. China.

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

Jimenez, R. 1992. Síndrome de Taura (Resumen). *Acuicultura del Ecuador*.1: 1-16.

Jiménez, F. 1996. Acciones para prevenir enfermedades. Memorias del Foro International de Camaronicultura 1996. Agosto 1-3, 1996. Mazatlán, Sinaloa, México.

Jory, D. 1998. Gold Shrimp Farming in 1997. Aquaculture Magazine Buyer's Guide '98. pp. 32-41.

Kanchanaphum, P; C Wongteerasupaya, N Sitidilokratana, V Boonsaeng, S Panyim, A Tassanakajon, B Withyachumnarnkul, TW Flegel. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. 34: 1-7

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

Kasornchandra, J.; S Boonyaratpalin, 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, W; G Abele. 1990. Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18s rRNA nucleotide sequences. J. Crust. Biol. 10:1-13.

Kim, CK; PK Kim, SG Sonn, DS Sim, MA Park, MS Heo, TH Lee, JD Lee, HK Jun and KL Jang. 1998. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in Penaeid shrimp. Journal of Fish Disease. 21:11

Kimpel, K. 1999. Aquatic Diagnostic Labs. San Diego, CA, USA. Com. pers.

Krol, R M; WE Hawkins, RM Overstreet. 1990 Reo-like virus in white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): co-occurrence with *Baculovirus penaei* in experimental infections. *Diseases of aquatic Organisms*. 8:45-49.

Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

LeBlanc, BD; RM. Overstreet. 1990. Prevalence of *Baculovirus penaei* in experimentally infected white shrimp (*Penaeus vannamei*) relative to age. *Aquaculture*, 87:237-242.

LeBlanc, BD; RM. Overstreet, JM. Lotz. 1991. Relative susceptibility of *Penaeus aztecus* to *Baculovirus penaei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 22:173-177.

Lara, C. 1999. Los cinco vectores mas importantes en la propagacion del virus de la mancha blanca y el virus de la cabeza amarilla y su control en el cultivo de los camarones del genero *Penaeus*. Com. Pers. Hidrocultivos de la Costa, Cartagena, Coombia. Marzo de 1999.

Lester, RJG; A Doubrovsky, JL Paynter, SK Sambhi, JG Atherton. 1987. Light and electron microscope evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeus plebejus*. *Dis Aquat. Org.* 3: 217.

Lightner, DV. 1984. A review of the diseases of cultures penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. Pp 57-80 in M. Sharif, R. Subasinghr and JR Arthur, editors. *Diseases in Asian Aquaculture*. Manila, Philipinas.

Lightner DV. 1985. A review of the diseases of cultured penaeid shrimp and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. Pp 79-103 in *Proceedings of*

the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/shrimps, Y Yaki, JH Primavera and JA Llobrera, editors. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Iloilo, Philippines.

Lightner, D V. 1992. Shrimps virus diseases: diagnosis, distribution and management. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA. Pps. 79-103

Lightner, DV. 1993. Diseases of penaeid shrimps. Pp. 393-486 in In: JP McVey, editor. CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture. Second Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Lightner, DV. 1996. Epizootología y diseminación de dos virus de los camarones penéidos en las Américas y su impacto sobre el comercio internacional. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15: 579-602.

Lightner, DV. 1996. A Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. The World Aquaculture Society Press, Boca Raton, FL.

Lightner DV; RM Redman. 1981. A Baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. J. Invertebr. Pathol. 24: 311

Lightner, DV; RM Redman, TA Bell, JA Brock. 1983b. Detection fo IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. J. World Maricul. Soc. 14: 212-225.

Lightner, DV; RM Redman, TA Bell. 1983. Observation on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the Baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture. 32: 209-233.

Lightner, DV; RM Redman, TA Bell. 1983. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal Pathology* 42: 62-70.

Lightner, DV; RM Redman. 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 45, 47-53.

Lightner, DV; RM Redman. 1989. *Baculovirus penaei* in *Penaeus stylirostris* (crustacea: decapoda) cultured in Mexico: unique cytopathology and a new geographic record. *Journal of Invertebrate Pathology* 53. 137-139.

Lightner, DV; RR Williams, TA Bell, RM Redman, LA Perez A. 1992a. A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES mar. Sci. Symp.* 194: 97-105

Lightner, DV; RM Redman, TA Bell, RB. Thurman. 1992b. Geographic dispersion of the viruses IHHN, BV and HPV as a consequence of transfers and introductions of penaeid shrimp to new regions for aquaculture purposes. Pp. 155-173 *in* A Rosenfield, and R Man editors. *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*. University of Maryland System, College, Park, Maryland, USA.

Lightner, DV; RM Redman, JP Bonami. 1992. Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Diseases of Aquatic Organisms*. 13: 235-239

Lightner, DV; BT Poulos, L Bruce, RM Redman, L Nunan, C Pantoja, J Mari, JR Bonami 1994. Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHHNV and HPV, and the Baculoviruses MBV and BP, US. *Marine Shrimp Farming Program* 10<sup>th</sup>

Anniversary Review, Gulf Coast Research Laboratory Special Publication. Ocean Springs, Mississippi: Gulf Research Reports. No. 1, pp. 59-85.

Lightner, DV; LS Jones, GW Ware. 1994. Proceedings of the Taura syndrome workshop: Executive Summary, Submitted Reports, and Transcribed Notes. Jan. 21-22, Univ. Arizona, Tucson.

Lightner, DV; RM Redman, KW Hasson, CR Pantoja. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure Diseases of Aquatic Organisms. 21: 53-59.

Lightner, DV; RM Redman, BT Poulos, LM Nunan, JL Mari, K. Hasson. 1997. Status of the major virus diseases of concern to the shrimp farming industries of the Americas: Known distribution, host and available detection methods. Proceedings of the IV Central American Symposium on Aquaculture, April 22-24, 1997. Tegucigalpa, Honduras. 36-48.

Lightner, DV; RM Redman, BT Poulos, LM Nunan, JL Mari, KW Hasson. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 16:146-160.

Lightner, DV; KW Hasson, BL White, M Redman. 1998. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. Journal of Aquatic Animal Health. 10: 271-281.

Lo, CF; JH Leu, CH Ho, CH Chen, SE Peng, TT Chen, CM Chou, PY Yeh, CJ Huang, HY Chou, CH Wang, GH Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms. 25:133-141.

Lo, CF; CH Ho, CH Chen, KF, L, YL Chiu, PY Yeh, SE Peng, HC Hsu, HC Liu, CF Chang, MS Su, CH Wang, GH Kou. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms*. 30: 53-72.

Lo,CF; CH Ho, SE Peng, CH Chen, HC Hsu, YL Chiu, CF Chang, KF Liu, MS Su, CH Wang, GH Kou. 1998. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27: 215-225.

Loh, PC; Y Lu and JA Brock. 1990. Growth of the penaeid shrimp virus infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in a fish cell line. *J. Virological Methods* 31: 189-196.

Lotz, JM. 1997. Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Disease of Aquatic Organisms*. Vol 30: 45-51.

Lu, Y; PC Loh, and JA Brock. 1989. Isolation, purification and characterization of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) from penaeus shrimp. *Journal of Virological Methods*. 26: 339-344.

Lu, Y; E C B. Nadala Jr., JA Brock, PC Loh. 1991. A new virus isolate from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-infected penaeid shrimps. *Journal of Virological Methods* 31: 189-196.

Luedman, RA; DV Lightner. 1992. Development of an in vitro primary cell culture system from the penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 101: 205-211.



Mari, J; JR Bonami, DV Lightner. 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. Journal of General Virology 74: 2637-2643.

Mari, J; JR Bonami, DV Lightner. 1998. Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. Diseases of Aquatic Organisms. 33: 11-17.

Murphy, FA; CM Fauquet, DHL Bishop, SA Gabrial, AW Jarvis, GP Martelli, MA Mayo, MD Summers. 1995. Classification and nomenclature of virus. Arch. Virol. 10: 1-586.

Nakano, H; H Koube, S Umezawa, K Momoyama, M Hiraoka, K Inouye and N Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. Fish Pathology. 29: 135-139.

Nunan, LM; DV Lightner. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Virological Methods. 63: 193-201.

Nunan, LM; BT Poulos, DV Lightner. 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in impoted commodity hrimp. Aquaculture. 160: 19-30.

Nunan, LM; BT Poulos, DV Lightner. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected shrimps. Diseases of Aquatic Organisms. 34: 87-91.

OIE (Office International des Epizootias). 1999. Diseases of crustaceans *in* International Aquatic Animal Health Code- 1999. Office International de Epizooties, 12 rue Prony, 75017 Paris, Francia. Section 2.3.

Overstreet, RM; KC Stuck, RA Krol, WE Hawlins. 1988. Experimental infection with *Baculovirus penaei* in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) as a bioassay. Journal of the World Aquaculture Society. 19: 175-187.

Owens, L; S De Beer, J Smith. 1991. Lymphoidal parvo-like virus in Australian prawns. Diseases of Aquatic Organisms. 11: 129.

Park, J; YS Lee. 1996. Patological study of a infectious lymphoid organ necrosis virus infection in penaeid shrimp (*Penaeus orientalis*). J. Vet Res 36: 1013-1016.

Park, JH; YS Lee, Y Lee. 1998. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. Diseases of Aquatic Organisms. 34: 71-75.

Peng, SE; CF Lo, CH Ho, CF Chang, GH Kou. 1998. Detection of White spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. Aquaculture 164: 253-262.

Pérez-Farfante, I; B. Kensley. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. Memoires du Museum National d' Histoire Naturelle. 175: 1-123.

PINIAR Periodismo Moderno. Nayarit Opina. Octubre 1996.

Rosenberry, B. 1993. Taura syndrome hits in Ecuador, again. Shrimp News International. 18:3- 6

Rosenberry, B. 1994a. Update on Taura syndrome in Ecuador. Shrimp News International. 19: 2-4.

Rosenberry, B. 1994b Taura syndrome ravages Ecuador. Shrimp News International. 19: 10-12.

Rosenberry, R. 1997. World Shrimp Farming. Annual Report, Shrimp News International.

Sambrook, J; EF Fritsch, T Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor Laboratory, : Cold Spring Harbor, NY.

Sano, T; T Nishimura, K Oguma, K Momoyama, N. Takeno. 1981. Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan. Fish Pathol. 15: 185-191.

SEMARNAP (Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca). 1996. Informe anual de actividades. Programa Nacional de Sanidad Acuícola. Dirección General de Acuicultura.

SEMARNAP (Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca). 1998. Informe anual de actividades. Programa Nacional de Sanidad Acuícola. Dirección General de Acuicultura.

Simms, D; PE Cizdziel, P Chomczynski. 1993 TRIzol: A new reagent for optimal single-step. Focus 15: 99-102.

Smullen, S. 1997. Viruses could affect shrimps stocks and Industry. NMFS Seeks Public input to ecological risk assessment. NOAA 97-R142.

- Sudha, PM; CV Mohan, KM Shankar, A Hegde. 1998. Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture* 167: 95-101.
- Summers, MD; GE Smith. 1987. A Manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin. No. 1555, 56 p.
- Supamattaya, K; RW Hoffmann, S Boonyaratpalin, 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. *Diseases of Aquatic Organisms*. 32: 79-85.
- Takahashi, Y; T Itami, M Kondo, M Maeda, R Fijii, S Tomonga, K Supamattaya, S Boonyaratpalin. 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathology*. 29: 121-125.
- Takahashi, Y; T Itami, N Suzuki, J Kasornchandra, K Supamattaya, R Khongpradit, S Boonyaratpalin, M Kondo, K Kawai, R Kusuda, I Hirono, T. Aoki. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of Bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *Journal of Fish Diseases* 19: 399-403.
- Trudel, M; P. Payment. 1993. Ultracentrifugation. Pp. 67-82 in M. Trudel and P. Payment, editors. *Methods and Techniques in Virology*. Chap 8. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Tsing, A; JR Bonamí. 1987. A new viral disease of the shrimp, *Penaeus japonicus* Bate. *J. Fish Dis.* 10: 139-141.

United States Department Of Commerce 1997. National Oceanic and Atmospheric Administration. National Marine Fisheries Service. Silver Spring, Maryland 20910. Office of International Affairs. F/LA2:RW/DW, IFR-92/27.

Vialard, JE; C D Richardson. 1993. The 1,629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhendrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein. Journal of Virology. 45:5859-5866.

Voytas, D. 1993. Resolution and recovery of large DNA fragments. In:Current Protocols in Molecular Biology Supl. 27, Cap. 1. *Escherichia coli*, Plasmids, and bacteriophages. Section 2.5 a.

Volkman, LE; BA Keddie. 1990. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. Seminars in Virology. 1:249-256.

Voyles, BA. 1993. The Biology of Viruses. Mosby-Year Book Inc. St. Louis Missouri. 386 pp.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Wang, CH; CF Lo, JH Leu, CM Chou, PY Yeh, HY Chou, MC Tung, CF Chang, MS Su, GH Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Disease of Aquatic Organisms. 23:239-242.

Wang, YC; CF Lo, PS Chang, GH Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. Aquaculture. 146: 221-231.

Wang, QB; I White, RM Redman, DV Lightner. 1999. *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus durarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 170: 179-194.

Weber, KO; M Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 224: 4406-44012.

Wigglesworth, J. 1994. Taura Syndrome' hits Ecuador farms. *Fish Farmer* 17: 30-31.

Wongteerasupaya, C; JE Vickers, S Sriurairatana, GL Nash, A Akarajamorn, V Boonsaeng, S Panyim, A Tassanakajon, B Withyachumnarnkul, TW Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cell of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21: 69-77.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



