

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**ESTANDARIZACION DE TECNICAS MOLECULARES PARA
EVALUAR LA PRESENCIA DEL VIRUS CABEZA AMARILLA (YHV)
EN GRANJAS CAMARONERAS.**



**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA**

JORGE ZAMBRANO GARCIA

Ensenada, Baja California. Febrero del 2002

**ESTANDARIZACION DE TECNICAS MOLECULARES PARA
EVALUAR LA PRESENCIA DEL VIRUS CABEZA AMARILLA
(YHV) EN GRANJAS CAMARONERAS.**

**TESIS
QUE PRESENTA:**

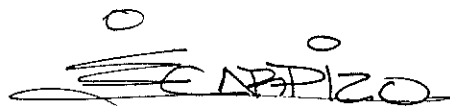
JORGE ZAMBRANO GARCÍA

APROBADA POR:



Dr. Jorge de la Rosa Velez

DIRECTOR DE TESIS



Dr. Eugenio Carpizo Ituarte

SINODAL



Oc. Fernando García Pamanes

SINODAL

Esta tesis fue patrocinada por CONACYT mediante el proyecto “Aislamiento, purificación y caracterización de la organización genómica del virus del Síndrome Cabeza Amarilla, a partir de camarones infectados en cultivo”. Proyecto # 26657B.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer principalmente a mis papás ya que sin su apoyo no lo hubiera logrado. A mi madre que insistía en una carrera para su hijo y que seguramente esta orgullosa y a mi padre que insistía en que me titulara y quien me ha enseñado mas que ninguna escuela. A mis abuelos que seguramente se acabaron las manos con sus bendiciones y a mis hermanos quienes confiaron siempre en mi.

Muy especialmente al Dr. De la Rosa ya que me enseñó todo lo que se sobre biología molecular, y muchas otras cosas que no se aprenden en los libros, por que me soporto mucho tiempo dándose el espacio para asesorarme y gracias a su ayuda termine esta tesis.

A los amigos que forme durante las diferentes etapas de la carrera: La Güera, el Chino, Peter y Etel (principalmente), Caco, Chuy, Edna, Memo, Gaby, Angélica, Julito, Javier, Juan, Pablo, Martín y tantos mas que en realidad no se me olvidan.

A mis compás de Mazatlán: Pinocho, Chore, Felipe (principalmente), Gaby, Güero, y tantos mas que tampoco se me olvidan.

A todos los del laboratorio que siempre estaban para responder mis dudas y ayudarme así estuvieran muy ocupados: Clarisa, Luis, Faustino y Yoli.

A mis sinodales, por su atención y recomendaciones, y por el tiempo que se dieron para revisar la tesis.

A todos mis maestros (que son muchos) que ayudaron con mi formación profesional y que aveces me hacían y los hacia pasar malos y buenos ratos, sin intención de dañar ¿?.

RESUMEN.

La camaronicultura ha presentado un gran crecimiento en México, permitiendo la formación de nuevos empleos y la introducción de divisas. Sin embargo, esta actividad ha sido fuertemente afectada por la introducción de enfermedades que ocasionan pérdidas de un alto porcentaje de la población de camarones que se encuentran en el sistema (granja). De estas enfermedades, las que presentan mayor grado de virulencia son las de origen viral, destacando entre ellas, en la última década, el Síndrome de la Cabeza Amarilla (YHV), descrito en Tailandia en 1990 y muy probablemente presente, en la actualidad, en granjas mexicanas. No existe remedio curativo para las epizootias virales, pero se han desarrollado métodos de detección. En general, para la detección de la presencia de virus, se cuenta con técnicas de diagnóstico tradicionales y moleculares, siendo las moleculares las más sensibles, oportunas, específicas y confiables. Entre estas técnicas se encuentran la de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la de la gota inmovilizada sobre un soporte sólido (Dot-Blot), que son utilizadas en este trabajo. Estas técnicas se encuentran descritas, mas no estandarizadas para cada virus o fragmento genómico, por lo que se requiere de hacerlo para su rápida, fácil y eficaz utilización. En este trabajo se realizó la estandarización de las técnicas de RT-PCR, Dot-Blot y Southern Blotting para la detección del virus cabeza amarilla. De esta estandarización se definió que el método del Trizol fue el adecuado para la extracción de RNA total, la pareja de cebadores YHV273 F y R dieron los mejores resultados de amplificación, el protocolo recomendado por el juego de reactivos Titan fue preferido sobre el recomendado por Tang y Lightner (1999), el uso directo de homogenizados crudos en la prueba de Dot-Blot, no dio los resultados esperados, aunque los productos de amplificación sí fueron útiles para realizar esta prueba como una forma de comprobación de los resultados de RT-PCR, y, por último, mediante la prueba de Southern Blotting, se confirmaron los resultados de las pruebas anteriores. Los métodos así estandarizados se aplicaron a una serie de muestras colectadas a lo largo del noroeste del Pacífico mexicano, donde se determinaron cinco zonas: 1.- norte de Nayarit, 2.- sur de Sinaloa, 3.- centro de Sinaloa, 4.- norte de Sinaloa, y 5.- sur de Sonora. Se encontraron resultados positivos para dos de las muestras tomadas, pertenecientes a la zona 1. Al mismo tiempo se llegó a la conclusión de que el nivel de infección que presentaron era bajo, encontrándose alrededor de 10^3 partículas virales por muestra positiva, en 1 ml de hemolinfa de un conjunto de 10 organismos. En este trabajo se pudo constatar la sensibilidad, oportunidad (24-48 horas para obtener el resultado una vez estandarizada la técnica), especificidad y confiabilidad de las herramientas moleculares, al igual que la flexibilidad con la que se puede trabajar con éstas, ya que se puede hacer una conjugación de técnicas para obtener resultados más sensibles y confiables.

INDICE.

Agradecimientos.....	IV
Resumen.....	V
Indice.....	VI
Indice de tablas.....	VIII
Indice de figuras.....	IX
Introducción.....	1
Antecedentes.....	9
Justificación.....	15
Hipótesis.....	16
Material y métodos.....	17
Origen y naturaleza de los controles.....	17
Extracción de RNA total.....	17
Amplificación del fragmento genómico de YHV mediante RT-PCR....	19
Preparación de la sonda molecular.....	22
Cuantificación de la sonda.....	23
Dot-Blot (hibridación RNA-DNA).....	23
Southern Blotting.....	25
Estrategia metodológica para la detección de YHV en las muestras de camarón.....	27
Recolección de muestras.....	27
Area de estudio	29

Resultados.....	33
Extracción de RNA.....	33
RT-PCR.....	34
Preparación de la sonda molecular.....	38
Marcado de la sonda.....	39
Cuantificación de la sonda.....	39
Dot-Blot.....	39
Southern Blotting.....	41
Discusión.....	43
Conclusión.....	53
Literatura citada.....	54
Anexo I: Soluciones y reactivos.....	61
Anexo II: Protocolos.....	63

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Comparación de técnicas diagnósticas de enfermedades virales en camarones silvestres y de cultivo.....	5
Tabla 2. Descripción del número de granjas y muestras que se colectaron según la zona y claves que se les asignó.....	29

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Localización de las zonas muestreadas.....	30
Figura 2. Extracción de hemolinfa del segundo segmento de camarón con una jeringa de 1 ml.....	31
Figura 3. Tubos Nunc de 3.5 ml utilizados para almacenar las muestras de hemolinfa.....	32
Figura 4. Contenedor de nitrógeno líquido, utilizado para la preservación de hemolinfa.....	32
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X, a 60 V, por 45 minutos, de extractos de RNA a partir de pleópodos (carriles 2 y 5) y bránquias (carriles 3 y 6) de los controles positivo y negativo, respectivamente. Los carriles 1 y 7 contienen una escalera molecular de 500 pb.....	33
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X, a 60 V, por 45 minutos, de los productos de amplificación de los controles positivo y negativo con los juegos de cebadores YHV1051 FyR. Y YHV273 F y R. Carriles 2-5: amplificación con los cebadores YHV273 F y R de extractos de pleópodos y branquias de los controles positivo y negativo, respectivamente. Carriles 8-11: amplificación con los cebadores YHV1051 F y R, de las mismas muestras. Carriles 6 y 12: Controles de reacción. Carriles 1, 7 y 13: Escalera molecular de 250 pb.....	37

- Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X, a 60 V, por 45 minutos, de los productos de amplificación de las dos muestras positivas a la presencia de YHV. Carril 1: muestra N3; carril 2: muestra N1; carril 3: escalera molecular de 250 pb; carril 4: control negativo; carril 5: control positivo..... 38
- Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X, a 60 V, por 45 minutos, del producto total de amplificación del fragmento 273 del genoma de YHV, a partir del control positivo..... 38
- Figura 9. Dot-Blot de los productos de amplificación del RT-PCR de diluciones 1:1, 1:4, 1:16, 1:64 de muestras selectas y controles. Columna H: control negativo; columna I: control positivo; cuadro 5B: muestra N1; cuadro 5D: muestra N3 40
- Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X, a 60 V, por 45 minutos, del producto de la amplificación con los cebadores YHV1051 F y R. Carril 8: control positivo; carriles 1 y 9: escalera molecular de 250 pb..... 41
- Figura 11. Membrana de nylon del Southern blotting de los productos de amplificación de RT-PCR de las muestras probadas por Dot-Blot. Carril 4: muestra N3; carril 8: control positivo..... 42

INTRODUCCION.

En México, al igual que en muchos otros países, la acuicultura es una muy importante fuente de ingresos y al mismo tiempo una sobresaliente fuente de trabajo. En las últimas décadas este sector ha experimentado un acelerado crecimiento, debido principalmente a su alta rentabilidad. Este hecho ha convertido a la acuicultura en una actividad muy atractiva para los inversionistas, generando la entrada de grandes capitales en este sector. Tan importante ha sido este crecimiento, que hoy en día una de las principales entradas de divisas a nuestro país, se debe a las exportaciones de los productos que genera esta industria (Poder Ejecutivo Federal, 1996).

En este contexto, dentro de las actividades acuiculturales, el cultivo de camarón es el que ha presentado el mayor y más rápido crecimiento, hasta alcanzar niveles de producción cualitativa y cuantitativamente importantes. En 1990 las exportaciones de camarón hacia Estados Unidos, alcanzaban las 16,800 toneladas métricas, mientras que para 1995 esta cantidad se incrementó hasta las 33,100 toneladas métricas. En 1996, en particular de las 67,000 toneladas métricas totales de la producción nacional de camarón, el 18% provenía de granjas camaronícolas, y este porcentaje se sigue incrementando (Lightner, *et al.*, 1997), tanto es así, que para 1999 se capturaron 85,000 toneladas métricas, de las cuales el 30% provenían de la acuicultura (Banco de

México-Fira, 2001). Si tomamos en consideración que México cuenta con un potencial mayor a las 475,000 hectáreas de terrenos salinos, con cualidades para la instalación de granjas camaronícolas (Gavaldón, 1993), de las cuales menos del 10 % están siendo utilizadas actualmente, es fácil suponer que esta actividad tiene un gran potencial de desarrollo.

Sin embargo, el rápido incremento en el número de granjas, ha provocado una alta demanda de larvas, lo que a su vez generó la aparición de laboratorios dedicados a la producción de las mismas, ya que el medio natural de donde eran obtenidas no satisfacía las necesidades de los productores. A pesar de esto, la demanda de larvas continuó en aumento, por lo que fue necesario la importación de este recurso, dándose inicio a un indiscriminado intercambio mundial de especies de camarón, que trajo como consecuencia la distribución de distintas enfermedades exóticas para los países importadores (Lightner *et al.*, 1997; Nunan *et al.*, 1998; Anónimo, 1999). Chagoya (1998), señala que la demanda estimada de postlarva en México para 1997 fue de 1,400 millones, la cual no se logró cubrir con la producción nacional, dejando un déficit de 537 millones, que serían probablemente importados de países como Panamá, Costa Rica, Colombia y Venezuela principalmente.

Otro factor al que se le atribuye la aparición de enfermedades en los cultivos de camarón, es la utilización de altas densidades, que da lugar a un

estrés por hacinamiento y alteración en el metabolismo del camarón. Por otro lado, también se cree que estas enfermedades ya se encontraban en el medio natural, solo que no se habían detectado. En este sentido, Lightner *et al.* (1998), señalan que las enfermedades son el resultado de un desequilibrio entre hospedero, medio ambiente y agente patógeno. La presencia de la enfermedad dependerá de a cuál de estos tres factores se esté favoreciendo y el estado del hospedero (edad, sexo, alimentación, etc.).

Entre estas enfermedades, las de origen viral representan el más serio problema para el desarrollo de la industria camaronicola. Los virus probablemente infecten a todo tipo de organismos y se cuenta con 1 billón de individuos por litro de agua (Fuhrman, 1999), aunque, no todos ocasionan desastres o infectan a los camarones. Sin embargo, existen algunos muy virulentos como es el caso del virus del Síndrome del Taura (TSV), el de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV), el Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), y el Síndrome de la Cabeza Amarilla (YHV), los cuales han sido los más sobresalientes durante la última década, ocasionando graves pérdidas económicas para este sector a nivel mundial.

Las enfermedades provocadas por los virus antes mencionados, tienen un gran impacto en los cultivos, ya que logran acabar con un alto porcentaje de las poblaciones de camarones en periodos de tiempo muy cortos. Estos

periodos van desde sólo algunos días, hasta unas cuantas semanas. Al no contar con remedios curativos sino solo de detección, es importante mantener un fuerte control sanitario en nuestros sistemas, mediante un diagnostico periódico de los camarones, para determinar si estos están infectados y en qué etapa de infección se encuentran.

Como es lógico suponer, la resolución de este serio problema ocupa el primer lugar en importancia para los productores, así como para los científicos involucrados en el área de las enfermedades de origen viral del camarón. En este sentido, la necesidad de un diagnóstico rápido y efectivo ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos para la detección de estos virus, particularmente en las etapas tempranas de la infección.

La mayoría de los métodos tradicionales para la detección de infecciones virales en camarones en cultivo, son complejos y requieren del desarrollo de habilidades y destrezas altamente especializadas. Además, en ocasiones son poco precisos (Mari, *et al*: 1995).

En la tabla I se presenta en forma resumida una evaluación de las técnicas diagnósticas actuales, para detectar enfermedades de origen viral que afectan los cultivos camaronícolas, según lo presentan de la Rosa-Vélez y Bonami (2002).

Tabla I. Comparación de técnicas diagnósticas de enfermedades virales en camarones silvestres y de cultivo.

Técnicas diagnósticas Tradicionales	Sensi- bilidad¹	Especi- ficidad²	Oportu- nidad³	Expertez Requerida⁴	Costo⁵
*Observación macroscópica de síntomas gruesos	+	+	-	+++	-
*Observación de tejido fresco al microscopio	+	+	-	+++	+
*Histología e histoquímica	++	++	-	+++	++
*Observación al microscopio electrónico de transmisión	+++++	+++	+	++++	++++ +
Técnicas diagnósticas moleculares					
Uso de sondas moleculares.					
*Gota inmovilizada sobre soporte sólido (Dot-Blot)	++++	++++	++++	++	++
*Hibridación <i>in situ</i>	+++++	+++++	+++	++	++
Uso de cebadores específicos					
*PCR a partir de ácidos nucleicos purificados	++++	++++	+++++	++	++++

Escala.-

- Nulo
+ Muy bajo
++ Bajo
+++ Intermedio
++++ Alto
+++++ Muy alto

1. Grado mínimo de infección detectada
2. Capacidad de discriminación entre entidades vírales
3. Eficiencia del diagnóstico
4. Habilidad y experiencia requerida para interpretar resultados
5. Grado de inversión para efectuar la técnica

De los métodos empleados para la detección de infecciones vírales en camarones en cultivo, los métodos moleculares se presentan como los más oportunos, sensibles, precisos y confiables para la detección de los virus. En primer lugar, estos métodos ofrecen la oportunidad de detectar a los virus en etapas tempranas de la infección, además de que no es necesario el sacrificio

de los organismos, a diferencia de los métodos clásicos en los cuales la detección de los virus sólo es posible una vez que el organismo ha muerto. Además, los métodos serológicos aún no han demostrado su eficacia y precisión para el diagnóstico oportuno de virus de camarón (Poulos, *et al.*, 1994).

Por otro lado, el uso de esta nueva tecnología se basa en la demostración de la especificidad de la secuencia de los ácidos nucleicos, y la elaboración de la sonda molecular se realiza a partir de fragmentos genómicos de cada virus. Esta herramienta tiene el potencial para ser usada para propósitos de diagnóstico, así como para muchos más estudios básicos de los mismos virus (Poulos, *et al.*, 1994).

Hasta la fecha, se han publicado una gran cantidad de métodos diagnósticos para detectar enfermedades virales en camarón (ver Lightner y Redman, 1998), basados en muy diversas herramientas moleculares (sondas y cebadores), con la desventaja que de muchas de ellas no se conoce con exactitud su ubicación en el genoma viral. Esto trae como consecuencia variación en la amplitud de la respuesta del método diagnóstico, relacionada con el grado de especificidad de la herramienta diseñada, en donde sondas o cebadores poco específicos pueden generar respuestas falsas positivas o, por otro lado, cebadores o sondas altamente específicas, construidas a partir de

regiones genómicas hipervariables, pueden dar respuestas falsas negativas entre virus no emparentados, pero de la misma especie.

Por esas razones, es necesario efectuar siempre una estandarización exhaustiva del método de diagnóstico que se empleará, para asegurar la repetibilidad de los resultados, su exactitud y precisión.

Para realizar la estandarización de un método de detección, se deberán cuidar varios aspectos, entre los cuales, el origen de la secuencia empleada, los límites de detección y la complementariedad entre técnicas, son las más importantes.

El origen de la secuencia empleada se refiere, dentro de la organización genómica, al grado de conservación filogenética de la región que fue clonada para dar origen a la herramienta molecular. Existen genes en el genoma viral que definen precisamente la naturaleza de un virus en particular, y otros, que comparten con otros miembros de la misma familia. En caso de haber sido clonado un fragmento de estos últimos, la respuesta a la aplicación de la herramienta puede confundir virus pertenecientes a una familia. Por lo tanto, es muy importante asegurar que el fragmento empleado como herramienta pertenezca a un gen de los que confieren las características específicas al virus que nos interesa detectar.

Los límites de detección deben ser evaluados y dependen principalmente de la técnica de detección empleada. Aunque se cuente con una herramienta molecular altamente específica, la forma de detección, es decir, la manera en que leemos los resultados, ya sea de la amplificación (por PCR) o la hibridación (por Dot-Blot), marcan el límite inferior observable de la presencia del virus. Es factible que haya presencia de virus en una muestra, pero si la cantidad de éste está por debajo del límite de detección, no será posible registrarlo.

En una batería de técnicas moleculares de detección, es muy útil que exista complementariedad. Las herramientas empleadas, como por ejemplo cebadores y sondas, deben de tener el mismo grado de especificidad para poder hacer comparables los resultados por distintas técnicas. Normalmente, si existe la presencia de virus en un conjunto de muestras, se deberán obtener resultados positivos mediante cualquier técnica empleada.

El cumplimiento de estas recomendaciones asegura el buen uso de la metodología molecular de diagnóstico y la ubica como una alternativa ideal para desarrollar una estrategia útil de control sanitario.

ANTECEDENTES.

Entre los virus que han provocado epizootias a nivel mundial, particularmente, TSV y IHNV han sido los principales responsables de las más altas mortalidades en los países del continente americano, así como en Hawai (Lightner *et al.*, 1983; Mari, 1998; Bonami *et al.*, 1997), mientras que WSSV y YHV son los responsables de enormes decrementos en la producción en los países asiáticos (Lightner *et al.*, 1997; Park, 1998; Jory y Dixon, 1999; Alvarado, 1999; Lu *et al.* 1995).

La aparición de IHNV en las granjas de la costa noroccidental del Pacífico entre los años de 1989 y 1990 ocasionó las pérdidas económicas más importantes del sector, al terminar prácticamente con todos los organismos en cultivo (Lightner, 1996). La pandemia originada por IHNV a los cultivos de *Penaeus stylirostris* forzó a los camaronicultores mexicanos a cambiar de especie introduciendo a sus granjas *Penaeus vannamei*, por ser una especie con mejor desempeño ante este virus. Sin embargo, la aparición de TSV en cultivos de *Penaeus vannamei*, en granjas de la región del río Taura, en Ecuador, originalmente descrita por Jiménez (1992), y su rápida dispersión a otros países de América, incluyendo las granjas mexicanas (Hasson *et al.*, 1995, Lightner, 1995), donde también se encuentra presente, ha generado altas

tasas de mortalidad en los cultivos. En México IHHNV se presentó entre los años de 1989 y 1990, y TSV apartir de 1995 (de la Rosa-Velez, 2001).

Por lo que respecta a YHV Y WSSV, fueron encontrados por primera vez en 1990 Y 1992-93, respectivamente, en el hemisferio oriental (de la Rosa-Vélez y Bonami 2002). Para los años 1995 y 1996, ya habían sido detectados en el hemisferio occidental en una granja de Texas, infectando a *P. setiferus* y *P. vannamei*, presentándose una infección conjunta en *P. setiferus* (Lightner *et al.*, 1997). Estudios más recientes confirman la presencia de estos virus en otros países del hemisferio occidental (Nunan, *et al.*, 1998; Chu-Fang *et al.*, 1999). Se tiene la sospecha de que estas enfermedades llegaron a América por medio de la importación de camarones congelados (Nunan *et al.*, 1998; Anónimo, 1999). WSSV ha presentado una propagación acelerada, reportándose en el año de 1995 en Texas. Para 1996, se detecta en Carolina del Sur, y entre 1999 y 2000 en America Central, Ecuador y México (Júarez-Mabarak, 2000). En 1999 se detectó en algunas granjas del área de Mazatlan, Culiacán y Guasave (Torres-Bujanda, 2000).

Tan alarmante ha sido el caso, que en marzo de 1999, la Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, emitió la Norma Oficial Mexicana de Emergencia (NOM-EM-001PESC-1999), que establece los requisitos y medidas para prevenir y controlar la introducción y dispersión de las

enfermedades denominadas como “síndrome de mancha blanca” y “síndrome de cabeza amarilla”. Con esto se presentó un paro total a las importaciones de camarón en todas sus presentaciones (fresco, congelado, cocido, etc.) o sus subproductos, al igual que la importación de *Artemia salina*, proveniente de América del Sur, incluyendo la introducción de organismos al resto del país de los estados de Quintana Roo, Chiapas y Oaxaca (Alvarado, 1999).

La distribución geográfica de los virus, a nivel mundial, así como la rápida dispersión de las epizootias causadas por estos agentes, aun entre regiones distantes, ponen al descubierto que los intercambios internacionales de camarones vivos con fines de acuicultura son el principal mecanismo para su dispersión. Otro importante mecanismo que puede contribuir a la diseminación de estos patógenos en el orbe, es el comercio de camarones congelados, que pueden servir de vector a virus exóticos para los países de importación. Lightner *et al.* (1997) señalan que en los Estados Unidos han sido detectados los virus de WSSV y YHV en camarones congelados importados a dicho mercado, y su infectividad ha sido comprobada. Por lo tanto, es muy factible que dentro de las larvas que se importan a México, con fin de surtir la demanda nacional de los productores de camarón, pudieran encontrarse presentes estos agentes infecciosos.

Como se explica anteriormente existen varias técnicas para la detección de virus, las cuales pueden ser auxiliares para evitar la introducción o diseminación de enfermedades. Las primeras detecciones de enfermedades que se realizaron hace aproximadamente 30 años, utilizaron métodos simples, como la observación al microscopio de signos físicos gruesos o métodos clásicos de microbiología para caracterizar principalmente bacterias patógenas presentes en el cultivo. Los métodos diagnósticos modernos aplicados en la camaronicultura, están basados en los métodos tradicionales de detección de enfermedades en peces, animales y para diagnóstico en humanos.

Algunos de los métodos más recientes, como son los basados en técnicas serológicas (utilización de anticuerpos monoclonales y policlonales) y, especialmente, las técnicas moleculares (sondas y PCR), han probado ser instrumentos de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades y la detección de patógenos en la industria camaronícola, especialmente para la demostración de la presencia de agentes virales (Lightner and Redman, 1998). Estas técnicas se han empleado desde hace aproximadamente 10 años y durante este tiempo se han publicado un gran número de posibles herramientas para el uso diagnóstico. No obstante, aún no se ha dado el caso de un ejercicio de estandarización generalizado entre los laboratorios de diagnóstico, lo que ha

hecho imposible la comparación global de resultados en una escala mundial (De la Rosa, comunicación personal¹).

YHV fue descrito originalmente por Nadala *et al.* (1997), como un posible miembro de la familia Rhabdoviridae, el cual posee un genoma de RNA de cadena sencilla, con polaridad negativa de aproximadamente 22 Kb. Sin embargo, Tang y Lightner (1999) ponen en duda la pertenecía de este virus a esa familia, ya que mediante análisis de RT-PCR e hibridación *in situ*, determinan la polaridad positiva del virus. Actualmente, se ha propuesto que este virus, así como el virus asociado a branquias (GAV), conforman una nueva familia para la que se propone el nombre de Pronidoviridae (Bonami, comunicación personal).² Los virus pertenecientes a esta familia son virus con genoma RNA (+), de doble cadena y con morfología bacilar.

En el caso particular de esta tesis, se enfocó el estudio al virus “cabeza amarilla” debido a que en la Facultad de Ciencias Marinas se está llevando a cabo un proyecto internacional que tiene como objeto caracterizar el genoma de dicho virus y generar herramientas moleculares útiles para la detección y el diagnóstico. Alrededor de este proyecto, se han desarrollado métodos moleculares de diagnóstico con base en información publicada sobre dicho

¹ J. De la Rosa. Facultad de Ciencias Marinas, UABC.

² J.-R. Bonami, UMR 5089 CNRS-IFREMER-UM2.

genoma. En este trabajo se pretende llegar a estandarizar técnicas de detección molecular específicas y confiables para el diagnóstico sensible y oportuno de la presencia de YHV en muestras de camarón.

JUSTIFICACION.

Con base en la alerta generada al aparecer la Norma Oficial de Emergencia en 1999, que alertaba a los camaronicultores acerca de la alta factibilidad de brotes tanto de “mancha blanca” como de “cabeza amarilla”, se consideró urgente el establecimiento de mecanismos de control sanitario para el monitoreo de los organismos introducidos en las granjas mexicanas (Alvarado, 1999). Como se establece en este trabajo, el desarrollo de métodos de diagnóstico que involucren herramientas moleculares, pueden ser del más alto valor para apoyar dicho control sanitario.

En este trabajo se utilizaron las técnicas de la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y gota inmovilizada sobre soporte sólido (Dot-Blot), que son métodos moleculares para diagnosticar y detectar patógenos (Lightner y Redman, 1998; de la Rosa-Vélez y Bonami, 2002). Este trabajo se realizó para establecer las bases de la utilización de estas técnicas de diagnóstico y poner a disposición de los productores herramientas eficaces para el monitoreo periódico de sus cultivos.

HIPOTESIS.

Basados en los antecedentes de utilización de herramientas moleculares (sondas y cebadores específicos) con buenos resultados para otro tipo de agentes virales en tejidos de camarón, es factible suponer que siguiendo la misma estrategia de diseño y aplicación en el caso del YHV, será posible encontrar las condiciones ideales de aplicación para detectar adecuadamente su presencia en muestras infectadas. Con base en los reportes publicados que indican la presencia de YHV en el hemisferio occidental a partir de 1996, es posible suponer que estén presentes en granjas camaroneras mexicanas.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Origen y naturaleza de los controles.

Para estandarizar los métodos de detección es necesario contar con controles eficaces para ese fin. Asimismo, en todo método de detección es fundamental la selección de controles adecuados tanto de reacción positiva como negativa. La interpretación correcta de los resultados depende absolutamente de ello (de la Rosa-Vélez y Bonami, 2002). En este trabajo, el control positivo consistió en tejido de camarones *P. vannamei* que fueron sometidos a una infección experimental con YHV en el laboratorio de Patología de la Universidad de Arizona, en Tucson, en marzo de 1996. Después del periodo de infección, estos especímenes se mantuvieron congelados a -70° C hasta el momento de su uso. El control negativo consistió en tejido de camarones *P. vannamei* sanos, pertenecientes a un cultivo experimental efectuado en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC.

Extracción de RNA total.

Dado que el YHV es un virus con genoma de RNA, es necesario realizar una extracción del RNA total de la muestra. Debido a la fácil degradación del RNA por parte de las RNAsas, para la realización de esta técnica se tomaron las siguientes precauciones: Todo el material y el agua empleada para la

preparación de los reactivos fueron tratados con DEPC (pirocarbonato de dietilo), que es un reactivo que desnaturaliza la RNAsa. Posteriormente, el DEPC fue degradado mediante esterilización en autoclave (121° a 15 psi). Además, toda manipulación fue efectuada con guantes y en un sitio aséptico previamente limpiado con etanol y agua tratada con DEPC.

Para la extracción de RNA total se probaron dos técnicas:

La primera fue la descrita por Chomczynski y Sacchi (1987). Esta técnica consistió en homogeneizar aproximadamente 100 mg de tejido (hemolinfa o pleópodos), en 2 ml de solución desnaturizante (tiocinato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM, sarcosil al 0.5%, β -mercaptoetanol 100 mM y agua tratada con DEPC) con ayuda de un homogeneizador mecánico. Posteriormente, se transfirió el homogeneizado a un tubo de 1.5 ml y se le añadió secuencialmente 0.1 de su volumen de acetato de sodio 2 M a pH 4.1, un volumen de fenol saturado y 0.2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). Se mezcló bien, y se incubó en hielo de 5 a 10 minutos. Se centrifugó a 12000 x g durante 20 minutos a 4°C.

Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio, se le añadió un volumen igual de isopropanol y se guardó a -80°C por 10 a 15 minutos. Se centrifugó a 12000 x g por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente,

se disolvió el precipitado en 0.3 ml de solución desnaturizante. Se añadieron 0.3 ml de isopropanol y se dejó precipitar durante 15 minutos a -80°C . Se centrifugó a $12000 \times g$ por 10 minutos a 4°C , y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 1 ml de etanol al 75%, se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos. Se sedimentó el RNA por centrifugado durante 15 minutos, se descartó el etanol y se dejó secar el RNA hasta que se evaporó todo el etanol. Por último, se disolvió en agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C .

La segunda técnica de extracción de RNA se basó en el juego de reactivos comercial TRIzol LS (Life Technologies, MD, USA), para cuyo objeto se siguieron las instrucciones del fabricante.

La cantidad de RNA extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñida con bromuro de etidio.

Amplificación del fragmento genómico de YHV mediante RT-PCR.

Tang y Lightner (1999) describieron un sistema de cebadores que amplifican un fragmento del genoma de YHV mediante RT-PCR. Es decir, diseñaron una pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1051 pares de bases (pb) y un segundo par de cebadores que amplifican 273 pb contenidas

en el interior del primer fragmento amplificado. Las secuencias de dichos cebadores son las siguientes:

YHV1051F.- 5'-ACA TCT GTC CAG AAG GCG TC-3'

YHV1051R.- 5'-GGG GGT GTA GAG GGA GAG AG-3

YHV273F.- 5'-CAA GAT CTC ACG GCA ACT CA-3'

YHV273R.- 5'-CCG ACG AGA GTG TTA GGA GG-3'

Los cebadores fueron sintetizados por la compañía Accesolab a un nivel de 50 nmolas. Se prepararon soluciones de trabajo a 20 μ M de cada cebador.

Ambos pares de cebadores se emplearon para la amplificación del genoma de YHV, en conjunto con el juego de reactivos comercial Titantm One Tube RT-PCR System (Boehringer). Este producto permite realizar la amplificación de fragmentos de RNA en un solo tubo, aprovechando la reacción de síntesis de cDNA que cataliza la transcriptasa reversa en un primer paso, y la amplificación de esa cadena de cDNA con los cebadores específicos y la acción de la Taq polimerasa, en un segundo paso, previa desnaturalización de la transcriptasa reversa a temperatura elevada. Este juego de reactivos recomienda la utilización de los siguientes volúmenes:

Componentes	Volumen de concentración final para RT-PCR
Master Mix 1	16.5 µl 1 µl 1 µl 1 µl 0.5 µl 2.5 µl
Aguas tratada con DEPC	
DNTP, 10 mM	
Cebador # I, 20 µl	
Cebador # II, 20 µl	
Muestra RNA, [500 ng]	
Solución DTT, 100 mM	
Master Mix 2	16.5 µl 10 µl 1 µl
Aguas tratada con DEPC	
Cebador RT-PCR 5X, con Mg ²⁺	
Enzima Mix	

Al igual que un programa de RT-PCR con las siguientes características:

Proceso	Temperatura	Tiempo	# de Ciclos
Síntesis de cDNA	50°C	30 min.	1
Desnaturalización de la transcriptasa reversa	94°C	2 min.	1
Desnaturalización del cDNA	94°C	30 seg.	10
Unión	45°-65°C	30seg	
Elongación	68°C	45 seg. – 4 min.	
Desnaturalización	94°C	30 seg.	25
Unión	45°-65°C	30 seg.	
Elongación	68°C	45 seg. – 4 min	
	Elongación de	5 seg. por ciclo	
Extensión final	68°C	> 7 min.	1
Preservación	4°C	Indefinido	

Para efectuar la reacción de polimerasa en cadena (PCR) se empleó un aparato termociclador marca Perkin–Elmer Modelo 480.

El producto de la RT-PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, teñido con bromuro de etidio, empleando como referencia de peso molecular una escalera molecular de 250 pb.

Preparación de la sonda molecular.

Una sonda molecular es un fragmento de DNA que representa la secuencia precisa de una porción del genoma de la especie que deseamos detectar o identificar, la cual ha sido marcada con alguna molécula reportera que nos indica la presencia de la sonda posteriormente a una reacción de hibridación molecular (de la Rosa-Vélez y Bonami, 2002).

En este trabajo, se preparó una sonda molecular para la detección de YHV, aprovechando el fragmento de 273 pb amplificado mediante RT-PCR a partir de los controles positivos. Para purificar el cDNA amplificado se empleó el juego de reactivos comercial Glass-Max (Gibco-BRL) (ver Anexo 2).

El marcado de la sonda se realizó según el protocolo descrito en el reactivo DIG High-Prime (Boheringer) (ver Anexo 2).

Cuantificación de la sonda.

Una vez marcada la sonda, es necesario cuantificarla para conocer con exactitud la cantidad que se agregará a la reacción de hibridación. Para la cuantificación se utilizó el juego de reactivos comercial DIG High-Prime Quantification Kit (Boehringer Mannheim) (ver Anexo 2).

Dot-Blot (hibridación RNA-DNA).

Se siguió el protocolo del laboratorio de Virología Molecular de la UM2 (Bonami, comunicación personal³).

A las extracciones de RNA de cada muestra y de los controles (+ y -), se les diluyó con el amortiguador de desnaturalización de RNA (500µl de formamida, 162 µl de formaldehído 12.5 M, 100µl de MOPS 1X) en las proporciones 1:4, 1:16 y 1:64.

Las muestras, sus diluciones y los controles se calentaron a 65°C por 5 minutos en baño maría y, posteriormente, los tubos se colocaron en hielo rápidamente para evitar la renaturalización.

Se aplicó 1 µl de cada muestra (1:1), sus diluciones (1:4, 1:16 y 1:64) y los controles a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer),

sobre la cual se dibujó una cuadrícula para ubicar cada muestra, sus diluciones y los controles, como se muestra a continuación:

Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Control +	Control -
1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64

La membrana se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se fijó el RNA a la membrana en un cross-linker a 12,000 joules/ cm², por 3 minutos.

A continuación, se realizó una prehibridación para acondicionar la membrana a las condiciones de hibridación. Con este objeto, la membrana se sumergió en el amortiguador de hibridación (High SDS; 20 ml. para una membrana de 100 cm²) (ver Anexo 1) por 3-4 horas a una temperatura de 42°C en una charola con movimiento. La hibridación propiamente dicha se inició colocando la membrana en el amortiguador de hibridación con la sonda (5-25 ng de sonda). La sonda fue previamente desnaturalizada por calentamiento a 100°C por 10 min. Se agregaron 2.5 ml por cada 100 cm² de membrana. Por último, se incubó a 42°C por toda la noche en una charola con movimiento.

³ Bonami, J.-R. UMR 5098 CNRS-IFREMER-UM2

Concluido el tiempo de hibridación, la membrana fue sometida a una serie de lavados, todos estos en una charola con movimiento. Se lavó la membrana dos veces con SSC 2X - SDS al 0.1 %, durante 15 minutos, a temperatura ambiente; dos veces con SSC 0.5X - SDS al 0.1 %, durante 15 minutos, a 68°C; una vez en amortiguador de lavado por 15 minutos, a temperatura ambiente; una vez con solución de bloqueo por 1 hora, a temperatura ambiente (100 ml. para una membrana de 100 cm²). Después, se incubó por 1 hora en una solución con Anti-DIG en solución de bloqueo a una proporción de 1:5000 (20 ml. para una membrana de 100 cm²). A continuación, se lavó dos veces por 15 minutos en amortiguador de lavado, a temperatura ambiente, y una vez por 5 minutos en el amortiguador de detección, a temperatura ambiente. Por último, la membrana se colocó en una bolsa de hibridación previamente cortada a la medida, y se le agregó la solución de coloración (10 ml para una membrana de 100 cm²). Se dejó reposar en la oscuridad por 2 horas o hasta que los puntos azules aparecieran. (ver Anexo 1 para las fórmulas de cada reactivo).

Southern Blotting.

Como prueba confirmativa de que las bandas presentes en la electroforesis de los productos de RT-PCR eran realmente fragmentos del genoma de YHV se efectuó un Southern-blotting en un aparato de blotting al

vacío (Vacuum Blotter BIORAD, modelo 785), siguiendo los pasos que indica el manual de dicho aparato.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, de los productos de RT-PCR. Realizada la electroforesis se depuró el gel en HCl 0.25 N. Se prosiguió con el traspaso del cDNA a la membrana, siguiendo los pasos indicados por el manual, verificando que todo el cDNA haya sido traspasado a la membrana.

La membrana se lavó en SSC 2 X, por 5 minutos, y se dejó secar entre dos papeles filtro. Finalmente, la membrana se secó junto con los papeles filtro a 80°C, por 30 minutos.

Al término de estos pasos la membrana se encontraba lista para la hibridación, por lo que se prosiguió con ésta siguiendo los pasos de hibridación descritos para el Dot-Blot.

Estrategia metodológica para la detección de YHV en las muestras de camarón.

Con el fin de efectuar de una manera rápida y económica la detección de YHV en las muestras colectadas la aproximación metodológica constó de dos fases:

1. Extracción de RNA total de las muestras de hemolinfa y aplicación de RT-PCR para detectar la presencia del virus en la población del estanque.
2. En cada muestra positiva, aplicación de Dot-Blot de extractos directos y Southern Blotting de productos de amplificación.

Recolección de muestras.

Con base en las características descritas, se decidió realizar una recolecta aleatoria respecto a las granjas existentes en la región de estudio. Para ese objeto, se consultó el Directorio Nacional de Empresas Acuiculturales (SEMARNAP, 1998), y en apego al presupuesto disponible, se seleccionaron al azar 20 granjas con la siguiente distribución: cinco en Sonora, 12 en Sinaloa y tres en Nayarit. Una vez realizada la campaña de recolecta, se concretó la toma de muestras en 14 de ellas, y un laboratorio productor de larvas, distribuidas como se recaba en la tabla 2: dos en Sonora, 10 en Sinaloa y tres en Nayarit. La campaña se llevó a cabo entre el 22 de noviembre y el 1 de diciembre de

1999. No se completó el plan inicial de recolecta en 20 granjas debido principalmente a la negativa de ingreso por parte de los responsables en cinco de ellas.

En las granjas visitadas se recolectó en uno o más estanques (ver tabla 2), en función de la información ofrecida por los responsables. Donde hubo más de una muestra obedeció a la existencia de estanques que presentaban, al tiempo de la recolecta, algún problema evidente de crecimiento, y en algunos casos en los estanques que contaban con diferentes especies (*Penaeus vannamei* o *P. stylirostris*) o que la procedencia de la larva fuera de diferente laboratorio, ya sea nacional o del extranjero. El número total de muestras fue de 22.

Se asignó una clave a cada muestra y cada granja con el fin de guardar el anonimato, como un requisito solicitado por la mayoría de los responsables. Asimismo, se agruparon en cinco regiones, como se detalla en la tabla II.

Tabla II. Descripción del número de granjas y muestras que se colectaron según la zona y claves que se les asignó.

Zona	# de Granjas	# de Muestras	Clave por muestra
1 Nayarit	3	4	N1, N2, N3, N4
2 Sur de Sinaloa	5	9	SS1, SS2, SS3, SS4, SS5, SS6, SS7, SS8, SS9
3 Centro de Sinaloa	2	3	CS1, CS2, CS3
4 Norte de Sinaloa	3	3	NS1, NS2, NS3
5 Sur de Sonora	2	3	SON1, SON2, SON3

Area de estudio.

El área de estudio se circunscribió a la zona costera del Pacífico noroccidental mexicano debido a su gran importancia cualitativa y cuantitativa en lo que se refiere a la actividad camaronícola. De las 32,146 t producidas por acuicultura en México en el año 2000, los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit produjeron el 93 % (Banco de México-Fira, 2001). En la actualidad, alrededor de 130 granjas funcionan en estos tres estados (Martínez-Córdoba, 1999), destacando la alta producción de las ca. 20 granjas del estado de Sonora (15,469 t en el año 2000) y el gran número de granjas existentes en el estado de Sinaloa (ca. 100), con una producción en el 2000 de 12,800 t; el estado de

Nayarit ocupa el tercer lugar nacional de producción camaronícola, con 1,648 t en el 2000 (Banco de México-Fira, 2001).

En la figura 1 se muestra la localización aproximada de los sitios de recolecta.

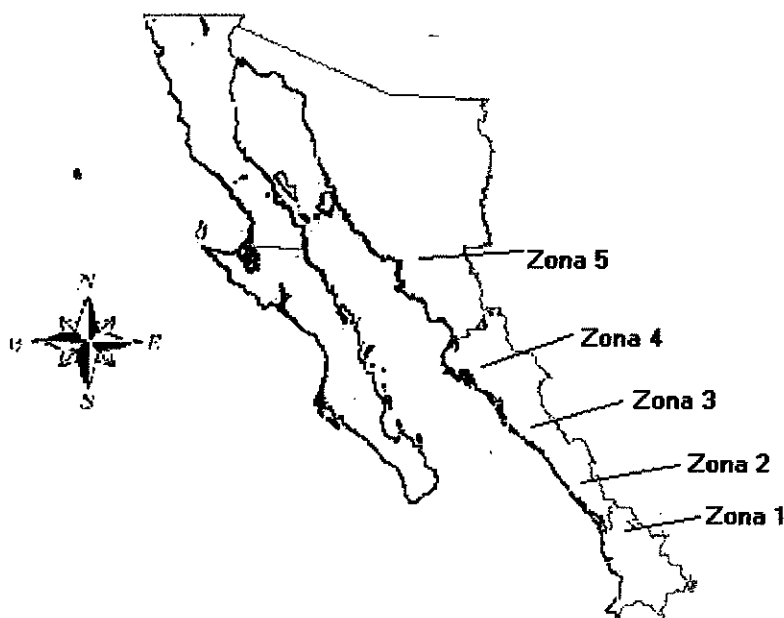


Figura 1. Localización de las zonas de recolecta.

En cada granja se colectaron al menos 10 organismos por estanque mediante una atarraya. Con ayuda de jeringas de insulina, se les extrajo hemolinfa en cantidad variable, dependiendo del tamaño del organismo (figura 2). La hemolinfa obtenida se depositó en criotubos de 3.5 ml marcados que contenían 100 μ l de una solución de citrato de sodio al 10%, como solución anticoagulante y se mantuvieron en frío (figura 3). Cada tubo comprendía la

hemolinfa de los 10 especímenes muestreados. Las muestras de hemolinfa se congelaron en nitrógeno líquido, haciendo uso de un contenedor para tal efecto (figura 5). En estas condiciones, se transportaron hasta el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Unidad Ensenada de la UABC para su procesamiento.



Figura 2. Extracción de hemolinfa del segundo segmento de camarón con una jeringa de 1 ml.



Figura 3. Tubos Nunc de 3.5 ml utilizados para almacenar las muestras de hemolinfa.



Figura 4. Contenedor de nitrógeno líquido, utilizado para la preservación de hemolinfa.

RESULTADOS.-

Extracción de RNA.

Las extracciones de RNA mediante la técnica de Chomczynski y Sacchi (1987), presentaron resultados muy pobres en cuanto a cantidad de RNA obtenido. Además, se trata de un procedimiento largo y complejo que pone en riesgo de degradación por RNAsas al RNA que se pretende extraer. Por este motivo se decidió probar con un método alternativo, más eficiente.

El método alternativo fue el de TRIzol LS. Mediante este método se lograron mejores resultados en cuanto a cantidad de producto obtenido (Fig. 5).

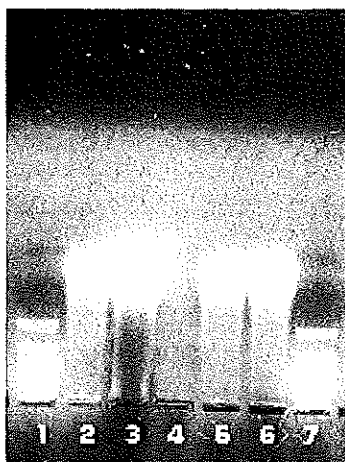


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X, a 60 V, por 45 minutos, de extractos de RNA a partir de pleópodos (carriles 2 y 5) y branquias (carriles 3 y 6) de los controles positivo y negativo, respectivamente. Los carriles 1 y 7 contienen una escalera molecular de 500 pb.

A partir de 100 μ l de hemolinfa en 1 ml de TRIzol, se obtuvo RNA en cantidad apreciable, a juzgar por la banda intensa y difusa, alrededor de las 250 pb.

RT-PCR

El termociclador se programó inicialmente siguiendo las especificaciones del fabricante del juego de reactivos respecto al primer paso de síntesis de cDNA, y según las recomendaciones de Tang y Lightner (1999) para el segundo paso de amplificación del cDNA.

La síntesis de cDNA (primer paso del protocolo) se efectuó en primera instancia a 50 °C. Posteriormente, se continuó con el programa recomendado por Tang y Lightner (1999): desnaturalización, 94°C por 45 segundos y unión, 60°C por 45 segundos. Esta secuencia se repitió por 40 ciclos. Al concluir, extensión final a 60 °C por 7 minutos. Mediante este programa, no se obtuvo ningún producto de amplificación, lo cual se corroboró al no presentarse banda alguna al aplicar una electroforesis a 5 μ l de la reacción del RT-PCR.

En un segundo intento, se modificó la temperatura de síntesis del cDNA a 55 °C, para evitar la formación de estructuras secundarias. El resto del

protocolo de amplificación se mantuvo igual. No obstante, se obtuvo el mismo resultado negativo que en la opción anterior.

A continuación, se modificó la segunda parte del protocolo, empleando las sugerencias del juego de reactivos Titan. Las principales modificaciones incluyen un tiempo de elongación a 68 °C y amplificación en dos etapas: la primera con repetición del programa por 10 ciclos, y la segunda, con un incremento de 5 segundos en el tiempo de elongación cada ciclo, por 25 ciclos. Además, los tiempos de desnaturalización y unión se redujeron a 30 segundos y se dio un tiempo de extensión final de 7 minutos a 68 °C. Realizada esta serie de cambios, se llegó al siguiente programa:

Proceso	Temperatura	Tiempo	# de Ciclos
Síntesis de cDNA	55°C	30 min	
Desnaturalización de la transcriptasa reversa	94°C	2 min.	
Desnaturalización del cDNA	94°C	30 seg.	10 ciclos
Unión	60°C	30 seg.	
Elongación	68°C	1 min.	
Desnaturalización	94°C	30 seg.	25 ciclos
Unión	60°C	30 seg.	
Elongación	68°C	1 min.	
	Elongación de	5 seg. Por ciclo	
Extensión final	68°C	7 min.	
Preservación	4°C	Indefinido	

Al implementar estas condiciones, se obtuvo un buen producto de amplificación (figura 6). Un último paso de estandarización, se refirió a la posibilidad de reducir el volumen de reacción a la mitad, con el fin de economizar reactivos.

Utilizando estas condiciones se obtuvieron buenos resultados, por lo que se consideró emplear rutinariamente la mitad del volumen de reacción. La mezcla de reacción, entonces, consistió en agregar a un tubo de PCR de 0.5 ml, 0.5 μ l de dNTP, 0.5 μ l del cebador 1 [20 μ M], 0.5 μ l del cebador 2 [20 μ M], 0.5 μ l de RNA [$\approx$ 250ng], 1.25 μ l de solución de DTT, 5.0 μ l de amortiguador RT-PCR 5X, 0.5 μ l de mezcla enzimática y la cantidad suficiente de agua estéril tratada con DEPC, para completar 25 μ l. Con excepción de la muestra de RNA y los cebadores, los demás reactivos forman parte del juego de reactivos empleado (ver Anexo 2).

En primera instancia se probaron los dos juegos de cebadores (YHV1051 F y R, y YHV273 F y R) con los controles positivo y negativo, obteniéndose amplificaciones del control positivo con ambos sistemas, aunque la amplificación del fragmento 273 produjo una banda más concentrada (figura 6), por lo que este par de cebadores se eligió para el procesamiento de las muestras.

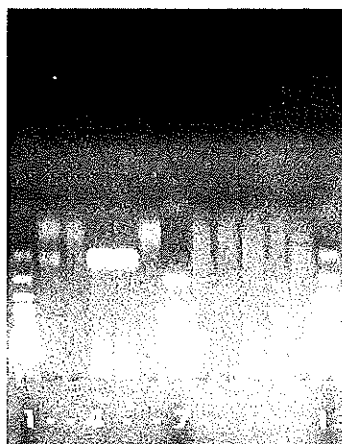


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X, a 60 V por 45 minutos, de los productos de amplificación de los controles positivo y negativo con los juegos de cebadores YHV1051 F y R. Y YHV273 F y R. Carriles 2-5: amplificación con los cebadores YHV273 F y R de extractos de pleópodos y branquias de los controles positivo y negativo, respectivamente. Carriles 8-11: amplificación con los cebadores YHV1051 F y R, de las mismas muestras. Carriles 6 y 12: Controles de reacción. Carriles 1, 7 y 13: Escalera molecular de 250 pb.

El resultado de aplicar el RT-PCR al total de las muestras fue la amplificación de dos de ellas (N1 y N3) (figura 7), ambas extraídas de organismos *P. vannamei* de dos estanques sin problemas de salud aparentes.

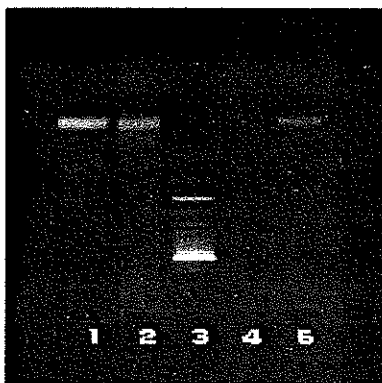


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X, a 60 V por 45 minutos, de los productos de amplificación de las dos muestras positivas a la presencia de YHV. Carril 1: muestra N3; carril 2: muestra N1; carril 3: escalera molecular de 250 pb; carril 4: control negativo; carril 5: control positivo.

Preparación de la sonda molecular.

De la amplificación del control positivo con los cebadores YHV273 F y R, se obtuvo una cantidad elevada del fragmento 273 (Fig.8).

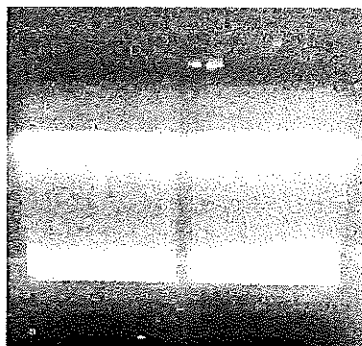


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X, a 60 V por 45 minutos, del producto total de amplificación del fragmento 273 del genoma de YHV, a partir del control positivo.

Marcado de la sonda.

El cDNA obtenido a partir de la escisión del gel y su limpieza con Glass-Max, se marcó con DIG High-Prime, para lo cual se probaron diversos volúmenes de muestra para el marcado. El protocolo descrito para el DIG High-Prime indica que se deben de agregar 6 μ l del DNA extraído del gel y aforar a 16 μ l con agua tratada con DEPC. No obstante, las primeras pruebas realizadas con esos volúmenes resultaron en cantidades muy bajas de sonda marcada, por lo que se probaron diferentes combinaciones de volumen, resultando la combinación de 15 μ l de la muestra y 1 μ l de agua tratada con DEPC, la que mayor cantidad de sonda marcada produjo.

Cuantificación de la sonda.

La concentración de sonda marcada con digoxigenina, cuantificada con el juego de reactivos DIG High-Prime Quantification Kit (Boehringer Mannheim), fue de 194 ng en 48.5 μ l, es decir, 4 ng/ μ l.

Dot-Blot.

El primer Dot-Blot se realizó con homogenizados crudos de pleópodos, empleando una cantidad final de sonda de 25 ng (límite superior recomendado por el protocolo). Los resultados fueron negativos, incluyendo el control positivo,

por lo que se realizó un segundo Dot-Blot incrementando a 30 ng la cantidad de sonda. Los resultados también fueron negativos.

Dados los resultados anteriores, se decidió utilizar extractos de RNA total para la prueba, manteniendo las demás condiciones. Los resultados, una vez más fueron negativos.

Por último, se realizó otro Dot-Blot con las amplificaciones de RT-PCR de muestras y controles, el cual tiñó para el control positivo y las muestras N1 y N3, lo que corroboró los resultados de la amplificación específica, como se muestra en la figura 9.

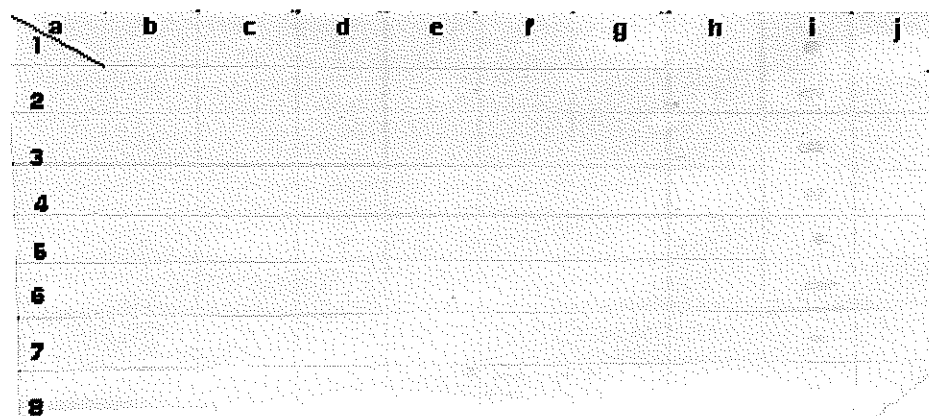


Figura 9. Dot-Blot de los productos de amplificación del RT-PCR de diluciones 1:1, 1:4, 1:16, 1:64 de muestras selectas y controles. Columna H: control negativo; columna I: control positivo; cuadro 5B: muestra N1; cuadro 5D: muestra N3.

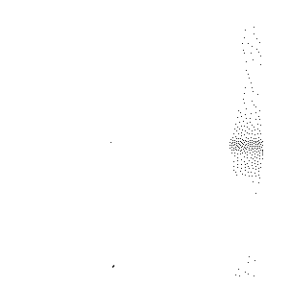
Southern Blotting.

Con el objeto de comprobar la validez de las muestras positivas, se realizó una amplificación de ellas con los cebadores YHV1051F y R. El resultado de la amplificación visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa, fue aparentemente negativo, como se observa en la figura 10.



Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X, a 60 V por 45 minutos, del producto de la amplificación con los cebadores YHV1051 F y R. Carril 8: control positivo; carriles 1 y 9: escalera molecular de 250 pb.

No obstante, se aplicó un Southern-Blotting, el cual dio como resultado hibridación con el control positivo (evidente en la figura 10) y la muestra N3, que había presentado la mayor concentración en el Dot-Blot (Fig.11).



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figura 11. Membrana de nylon del Southern blotting de los productos de amplificación de RT-PCR de las muestras probadas por Dot-Blot. Carril 4: muestra N3; carril 8: control positivo.

DISCUSION.-

El aspecto más importante a cuidar cuando se extrae RNA de tejidos, es mantener tanto el espacio de trabajo como los materiales y reactivos empleados libres de RNAsas. Esta enzima es ubicua y altamente resistente a la degradación. No se elimina por esterilización en autoclave, por lo que es necesario tratar todos los materiales y los reactivos empleados con DEPC, el cual es uno de los pocos compuestos que desnaturaliza la enzima. Sin embargo, dado que el DEPC es una sustancia tóxica, es necesario deshacerse de ella por medio de esterilización a 121° C.

El método propuesto por Chomczynski y Sacchi (1987) es un método manual de rutina empleado en diversos laboratorios para la extracción de RNA. Sin embargo, es un método que implica muchos pasos en su protocolo, cada uno de ellos sujeto a la posibilidad de contaminación por RNAsas, lo cual lo hace complicado. En el caso de este trabajo, no se obtuvo RNA por este método, hecho muy probablemente relacionado con la degradación del RNA por medio de RNAsas.

El Trizol LS es una mezcla de reactivos comercial que simplifica en tiempo y número de pasos del protocolo la extracción de RNA. La cantidad de RNA obtenido aquí mediante el uso de este reactivo fue muy adecuada para los fines que se perseguían. No obstante, se aprecia degradación del RNA

obtenido, a juzgar por la falta de bandas bien definidas en el gel de agarosa. Sin embargo, dado que el genoma de YHV es una molécula de RNA de doble hélice, no es degradada por la RNAsa común (Gesteland *et al.*, 1999). Por lo tanto, aunque las diferentes formas de RNA (mRNA, tRNA y rRNA) de los tejidos del camarón pudieran haber sufrido alguna degradación, muy probablemente el genoma del virus estaría intacto.

En la primera técnica empleada, aunque el RNA del genoma viral pudiera no estar degradado, no fue aparente debido a que la concentración de genoma viral es muy baja comparada con la de las diferentes formas de RNA del camarón.

Cowley *et al* (2000) indican que para la detección viral de RNA por la técnica de RT-PCR se necesitan al menos 10 fg de RNA blanco (genoma del virus). Si el genoma de YHV consta de 22,000 pb, el genoma de un solo virus pesará 4.3×10^{-18} g, es decir, que se requiere la presencia de por lo menos 10^3 virus en la muestra para poder ser detectado mediante esta técnica. Esa cantidad de virus, es muy pequeña y en ello reside la alta sensibilidad de la técnica para poder detectar infecciones incipientes.

Para realizar el RT-PCR con el fin de amplificar un fragmento de genoma viral, se decidió seguir las recomendaciones del protocolo del juego de reactivos

Titan para la primera parte, es decir, la síntesis del cDNA y emplear las sugerencias de Tang y Lightner (1999) para la amplificación del fragmento, ya que los cebadores utilizados fueron los diseñados por estos autores. Sin embargo, no se obtuvieron resultados.

La ausencia de resultados en este primer ensayo pudieron deberse a la temperatura de síntesis de cDNA empleada (50° C), la que posiblemente no fue suficiente para evitar estructuras secundarias del RNA molde. En el segundo intento, al agregarse 5° C a la temperatura de síntesis, tampoco hubo resultados. Por lo tanto, es factible que las condiciones del segundo paso del protocolo (la amplificación del cDNA), no fueran las óptimas. Cabe notar que el protocolo de PCR recomendado por Tang y Lightner (1999), no incluye una fase de extensión por ciclo, sino únicamente una extensión final de 7 minutos. Fue entonces que se decidió apegarse al protocolo completo del Titan, que emplea 10 ciclos con los pasos de desnaturalización, unión y extensión, segundos de 25 ciclos con una elongación progresiva de 5 segundos en la extensión, cada ciclo. Mediante esta estrategia, se permite que la Taq polimerasa realice su trabajo conforme aumenta el número de copias del fragmento en la reacción en cadena.

Debido al buen resultado de la amplificación del fragmento de 273 pb, fue que se decidió emplear éste como sonda para la hibridación. Además, se

recomienda el uso de sondas de menor tamaño para lograr una mayor penetración en el material fijado a la membrana (Wilkinson, 1992).

El uso en este trabajo de digoxigenina como molécula reportera para el marcaje de la sonda, representa una enorme ventaja sobre el uso de marcas radiactivas, ya que no se requiere de instalaciones ni cuidados especiales que hacían laborioso, peligroso y costoso el uso de radiactividad en la investigación con ácidos nucleicos.

En este caso, para obtener el fragmento marcado, se escindió éste del gel donde se separó y se limpió con Glass-Max para eliminar las moléculas contaminantes, subproductos de la reacción de PCR, lo que redujo la cantidad de material para ser marcado. Fue por esta razón que se hizo necesario agregar diferentes volúmenes crecientes a la reacción de marcado con DIG High-Prime. Finalmente, la proporción 15:1 (producto limpio:agua tratada con DEPC) rindió una buena cantidad de sonda marcada.

El ensayo de Dot-Blot se intentó realizar a partir de homogeneizados crudos de tejido de camarón, debido a razones prácticas. Para el uso de esta técnica en la granja, sería más sencillo poder efectuarla a partir de simples homogeneizados de tejido, que tener que extraer el RNA. Sin embargo, no se dieron los resultados esperados, ya que ni el control positivo se hizo evidente

en un primer ensayo. Por lo tanto, se procedió a realizar una extracción de RNA total de controles y muestras, con las cuales se realizó un segundo ensayo, el cual también fue negativo. La razón probable de este último resultado es que la concentración de virus en los tejidos era demasiado baja, por debajo de las decenas de nanogramos, que se considera el límite de detección de esta técnica (Lakeside, 1998).

Dados los resultados anteriores, con el objeto de comprobar que los fragmentos amplificados realmente correspondían a la porción del genoma de 273 pb, se procedió a aplicarle a los productos de amplificación la técnica de Dot-Blot, con los resultados positivos para las mismas muestras (N1 y N3), que habían sido amplificadas mediante el RT-PCR. Por lo tanto, esta prueba confirmó el hecho que los fragmentos amplificados pertenecen realmente al genoma de YHV.

Lo anterior corrobora dos hechos: 1) Dado que se aplicó una sonda específica, el resultado comprueba, sin lugar a dudas, que existe la presencia de YHV; y 2) que esta infección se encuentra entre las decenas de fentogramos y las decenas de nanogramos en una muestra de 1 ml de hemolinfa de un conjunto de 10 organismos.

La técnica de Southern blotting se empleó como una última comprobación de que la banda de amplificación obtenida en la electroforesis que siguió al RT-PCR, pertenecía efectivamente a un fragmento del genoma de YHV. Para este efecto, se emplearon los cebadores que amplifican las 1051 pb que contienen al fragmento de 273 pb. El resultado de la electroforesis teñida con bromuro de etidio, de los productos de amplificación, fue negativo, sin embargo, una vez aplicada la hibridación sobre la membrana de nylon a la que se transfirió el material mediante la técnica de Southern blotting, se detectaron las bandas correspondientes al control positivo y la muestra N3.

El resultado obtenido indica que los cebadores diseñados para amplificar el fragmento de 1051 pb no son tan efectivos como los que se emplearon para amplificar el fragmento de 273 pb. Esto puede tener su explicación en el hecho que no se conoce con exactitud la región genómica a partir de la cual se diseñaron los cebadores. En términos filogenéticos, existen en los genomas de los organismos regiones variables e invariables. Si las herramientas moleculares se diseñan sobre regiones variables, es factible que su poder de detección y diagnóstico se vea afectado, produciendo falsos negativos. En el caso contrario, si estas herramientas se diseñan sobre regiones que se encuentran conservadas filogenéticamente, es decir, sobre porciones invariables a nivel del taxón en cuestión, se corre el riesgo de generar falsos positivos.

Para el resultado aquí obtenido, es factible que se trate del primer caso, en el que los cebadores diseñados para amplificar el fragmento de 1051 pb, no realicen óptimamente la unión con el fragmento blanco debido a disparidades entre secuencias.

Con base en lo anterior, se puede asegurar que las muestras que resultaron positivas presentan la infección, y las negativas, o no están infectadas o, si lo están, su grado de infección o contacto con el virus está por debajo del límite mencionado.

En los estanques donde se tomaron las muestras N1 y N3 no se presentaban problemas de salud, sin embargo, se evidenció la presencia del virus. Este resultado se puede explicar en función de las bajas concentraciones encontradas, lo que indicaría una infección incipiente, o bien, que la cepa del virus presente tuviera menor virulencia que la que provocó en Asia alta mortalidad en las poblaciones en cultivo de *P. monodon*, o, inclusive, que las líneas de camarón *P. vannamei* en cultivo presentaran alguna resistencia natural al virus o que las condiciones ambientales particulares de las granjas mexicanas, no fuesen las adecuadas para el desarrollo de un brote epizootico. No obstante, es necesario realizar investigación para poder discernir entre estas posibilidades o saber, en su caso, la importancia de cada una de ellas para generar un resultado como el aquí presentado.

En resumen, las técnicas moleculares empleadas fueron útiles para la detección de YHV en dos de las muestras analizadas (N1 y N3), pertenecientes a la región 1. Este es el primer reporte de la presencia del virus productor del "síndrome cabeza amarilla" en México.

Mediante este trabajo se pudo constatar la sensibilidad de las herramientas moleculares para evaluar la presencia de virus en camarones y la flexibilidad con que se puede trabajar con estas en conjunto para lograr una detección a una etapa muy temprana de infección. Como en el texto se explica no sólo se puede utilizar una herramienta sino que se puede hacer una conjugación de éstas para que presenten mayor sensibilidad, como fue el caso de realizar un RT-PCR a las extracciones de RNA para amplificar el fragmento del virus y obtener una mayor concentración de éste, y después realizar un Dot-Blot o un Southern blotting para comprobar que el producto de amplificación pertenece realmente al virus que se desea detectar, mediante la sonda específica. Esto debido a que si desde un inicio se cuenta con una concentración muy pequeña de virus y se realiza un RT-PCR posiblemente no se lograría obtener una concentración suficiente como para detectarlo en un gel de agarosa, pero si en un Dot-Blot o un Southern blotting, lo que nos confiere una alta confiabilidad.

Por otro lado, el hecho de no ser necesario matar al organismo, ya que basta con tener una muestra de hemolinfa, aunado al corto tiempo (24-48 h) que implica llevar a cabo el ensayo total, comparado con las técnicas tradicionales de histología, hacen de esta opción la más oportuna en la labor de diagnóstico.

Por último, dado que el diagnóstico se hace empleando la información genética (genoma) del virus en cuestión, lo hace sumamente preciso, con la condición de que las herramientas moleculares a emplear hayan sido diseñadas propiamente.

En atención a lo marcado en la Norma Oficial de Emergencia de 1999, donde se obliga la cuarentena y análisis diagnóstico para evitar la introducción y dispersión de enfermedades de origen viral a granjas camaroneras en territorio mexicano, se sugiere instaurar el diagnóstico mediante herramientas moleculares como una práctica rutinaria en el comercio y tránsito de larvas, poslarvas, reproductores y camarones en general, en cualquiera de sus presentaciones (fresco y congelado). Aunque esta práctica se está aplicando con mayor intensidad y regularidad para la detección de WSSV y TSV, se recomienda que, dado el hallazgo de YHV en granjas mexicanas presentado en este trabajo, se instaure, asimismo, el método molecular para la detección de YHV.

La instancia oficial responsable de evitar el ingreso y diseminación de agentes patógenos de origen viral en la granjas camaroneras, podría ser quien coordinara un ejercicio de estandarización, como el que se presenta en este trabajo, con el fin de establecer métodos de detección y diagnóstico moleculares generalizados y uniformes, que todo laboratorio involucrado debiera aplicar para lograr una unificación de criterios para el control sanitario del material biológico vivo (larvas, poslarvas y reproductores) o congelado que ingresa al país o que se desplaza entre laboratorios, granjas y procesadoras, en el territorio mexicano.

CONCLUSIONES.-

1. Las técnicas de RT-PCR, Dot-Blot y Southern Blotting utilizadas para el diagnóstico del virus YHV presentan una sensibilidad y confiabilidad alta, al igual que permiten una detección oportuna a un grado de infección bajo.
2. En este trabajo se demuestra la flexibilidad con que se puede trabajar implementando diferentes técnicas moleculares.
3. YHV está presente en granjas camaroneras de la costa noroccidental del Pacífico mexicano.
4. Las muestras que resultaron positivas para la presencia del virus, pertenecen a camarones *P. vannamei*.
5. Se considera apropiado aplicar las herramientas moleculares para el control sanitario rutinario respecto a la posible introducción y dispersión de YHV, dadas sus características comprobadas de sensibilidad, oportunidad, confiabilidad y precisión.

LITERATURA CITADA.-

Alvarado, G. 1999. Comentarios sobre la Norma Oficial de Emergencia que intenta proteger a los productores mexicanos de las enfermedades de la Mancha Blanca (WSSV) y Cabeza Amarilla (YHV). *Panorama Acuícola*. 4(4); 30.

Anónimo. 1999. La mancha blanca. *Panorama Acuícola*. 4(4): 18-19

Anónimo. 2001. Análisis del sector camaronero en México. *Panorama Acuícola*. 7(1): 12-13.

Banco de México-Fira. 2001. Análisis del sector camaronero en México. *Panorama Acuícola*. 7(1): 12-13.

Bonami J.R., K.W. Hasson, J. Mari, B.T. Poulos and D.V. Lighthner. 1997. Taura Syndrome of marine penaeid shrimp: Characterization of the viral agent. *Journal of General Virology*. 78: 313-319.

Chagoya, P. 1998. Estudio de viabilidad técnica, económica y financiera de un laboratorio productor de postlarvas de camarón (*Penaeus stylirostris*) San Felipe, Baja California. Tesina de Diplomado. U.A.B.C. 87 pp.

- Chomczynski, P. y Sacchi, N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thyocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Chu-Fang L., Hui-Chen H., Meng-Feng T., Ching-Hui H., Shao-En P., Guang-Hsiung K. and Lightner D. V. 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms.* 35: 175-185.
- Cowley J. A., Dimmock C. M., Spann K. M. and Walker P. J. 2000. Detection of australian gill-associated virus (GAV) and lymphoid organ virus (LOV) of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR. *Diseases of Aquatic Organisms.* 36: 159-167.
- De la Rosa-Velez J. 2001. Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Cabeza Amarilla (YHV) dos amenazas potenciales a los cultivos camaronicolas en México. *Panorama Acuicola.* 6 (2): 18-19
- De la Rosa-Velez J. y J.—R. Bonami. 2002. Herramientas moleculares: una estrategia para la prevención de epizootias virales en cultivos de camarón. En: martínez-Córdoba, L.R. (ed.). *Avances y Tendencias en Camaronicultura.* DICTUS. AGT Editor. Hermosillo, México. (En prensa).

Fuhrman J. A. 1999. Marine viruses and their biological effects. *Nature*. 399: 541-548.

Gavaldón, A. C. 1993. Opciones de desarrollo e instrumentación de la acuicultura del camarón en el Golfo de Santa Clara, Sonora. Tesis de Licenciatura. U.A.B.C. 62 pp.

Gesteland, R.F., T.R. Cech and J.F. Atkins. 1999. *The RNA World*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. 709 pp.

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

Jimenez R. 1992. Síndrome de Taura (resumen). *Acuicultura del Ecuador. Rev. Especial Cámara Nac. Acuacult.* 1: 1-16.

Joryl D. E. and Dixon H. M. 1999. Presencia del virus Mancha Blanca en camarones de América Central. *Panorama Acuícola*. 4(5); 8-11.

- Juárez-Mabarak I. M. 2000. La enfermedad de la Mancha Blanca. *Panorama Acuicola*. 5 (6): 28-31.
- Kasornchandra L., Boonyaratpalin S. and Itami T. 1998. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture*. 164:243-251.
- Lightner D. V. 1996. Epizootiology, distribution and the impact of international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15 (2): 579-601.
- Lightner D. V. and Readman R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201-220.
- Lightner D. V. and Readman R.M, Hasson K.W. and Pantoja C.R. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: histopathology and ultrastructure. *Dis. Aquat. Org.* 21: 53-59.
- Lightner D. V., Readman R.M., Readman T.A. Bell and Brock J.A. 1983. Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* an *Penaeus vannamei* imported in to Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society*. 14: 212-225.

- Lightner D. V., Readman R.M., Poulos B.T., Nunan L.M., Mari J.L. and Hasson K.W. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Review of Science and Technology of the Office of International Epizootics. 16(1): 146-160.
- Lu Y., Tapay L.M., Loh P.C., Brock J.A. and Gose R.B. 1995. Distribution of yellow-head virus in selected tissues and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. Diseases of Aquatic Organisms. 23: 67-70.
- Mari J., Lightner D. V., Poulos B.T. and Bonami J.R. 1995. Partial cloning of the genome of an unusual shrimp parvovirus (HPV): use of gene probes in disease diagnosis. . Diseases of Aquatic Organisms. 22: 129-134.
- Mari J., Lightner D. V., Poulos B.T. and Bonami J.R. 1998. Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. Diseases of Aquatic Organisms. 33: 11-17.
- Martínez-Córdoba, L.R. 1999. Cultivo de Camarones Peneidos. Principios y Prácticas. DICTUS. AGT Editor. Hermosillo, México. 283 pp

- Nunan L.M., Poulos B.T. and Lightner D. V. 1998. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*. 160: 19-30.
- Nunan L.M., Poulos B.T. and Lightner D. V. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34: 87-91.
- Park J. H., Lee Y. S., Lee S. and Lee Y. 1998. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34: 71-75.
- Poder Ejecutivo Federal. 1996. Programa de Pesca y Acuicultura 1995-2000. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México. 95 pp.
- Poulos B.T., Lightner D.V., Trumper B. and Bonami J.R. 1994. Monoclonal antibodies to the penaeid shrimp parvovirus, infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHN). *Journal of Aquatic Animals Health*. 6: 149-154.

- Tang K. F. and Lightner D. V. 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. Diseases of Aquatic Organisms. 35: 165-173.
- Torres-Bujanda C. A. 2000. Producción de camarón de cultivo en el noroeste de México. Panorama Acuícola. 6 (1): 14-17.
- Wilkinson, D.G. (ed.) 1992. *In situ* Hybridization. A Practical Approach. IRL Press. Oxford. 163 pp.

ANEXO 1.-

Soluciones y Reactivos.

Geles de agarosa.-

Amortiguador TBE (Tris-Borato-EDTA) al 0.5%.
1.2% de agarosa (GIBCOBRL®).
5µl de EtBr (bromuro de etilio) por cada 100 ml.

Amortiguador I.- "Amortiguador de ácido maléico".

Acido maléico 0.1 M.
NaCl 0.15 M (cloruro de sodio).
Ajustar a pH 7.5 (20°C).

Amortiguador II.- "Amortiguador de solución de bloqueo".

Solución bloqueadora 1X (Boehringer Mannheim GmbH) diluida 1:10 en amortiguador I

Amortiguador III.- "Amortiguador de detección".

Tris-HCl 0.1 M (Trisma-ácido clorhídrico)
NaCl 0.1 M (cloruro de sodio).
MgCl₂ 50 mM (cloruro de magnesio).
Ajustar pH a 9.5 (20°C).

Amortiguador IV.- "Amortiguador de TE (Tris-EDTA)"

Tris-HCl 10 mM.
EDTA 1mM (Acido etildinitrilo tetracético)
Ajustar pH 8.0

Amortiguador de Hibridación.- "High SDS (dodecil sulfato de sodio)".

SDS al 7%.
SSC 5X (amortiguador de citrato de sodio salino).
NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7.0.
N-lauroylsarcosina 0.1% (p/v).
1/5 en volumen de solución de bloqueo 10X.
50% volumen de formamida desionizada.

Amortiguador de lavado y bloqueo DIG.

Amortiguador I 10X.
Solución de bloqueo 10X.
Solución de detección 10X.

Amortiguador de lavado.-

Amortiguador I + 0.3 % de Tween 20.

Solución de coloración.-

Preparar siempre fresco

200 μ l de NBT/BCIP en 10 ml de amortiguador III

Solución anticuerpo.-

Diluir anti-DIG-AP 1:2000 en amortiguador II.

Solución de transferencia.-

NaCl 0.6 N.

NaOH 0.5 N (hidróxido de sodio).

Solución de depuración de gel.-

0.25 N HCl (ácido clorhídrico).

Amortiguador MOPS 1X.-

MOPS 20 mM.

Acetato de sodio 5mM.

EDTA 1mM.

Ajustar a pH 7.0.

Solución de bloqueo.-

1 % reactivo bloqueador en amortiguador I.

NOTA.- El pH se puede ajustar con HCl si es básico y con NaOH si es ácido.

ANEXO 2.-

Protocolos.

- **TRIZOL® LS Reagent, de Life Ttechnologies.**

- 1.- Homogeneizar en un tubo eppendorff 100 mg ó 100 µl de muestra con 1 ml de Trizol (≈10% muestra-90% Trizol).
- 2.- Centrifugar la muestra a 12,000 x g, por 10 minutos a una temperatura de 2°-8°C. Descartar el botón y recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.
- 3.- incubar la muestra por 5 minutos a 15°-30°C. Adicionar 0.2 ml de cloroformo por cada mililitro de Trizol utilizado, agitar rigurosamente por 15 segundos e incubar de 2-3 minutos a 15°-30°C.
Centrifugar la muestra a 12,000 x g, por 15 minutos a una temperatura de 2°-8°C.
- 4.- Se obtienen dos capas. transferir la fase acuosa a un tubo nuevo (no tirar la otra fase).
Agregar 1 ml de etanol al 100% por cada mililitro de Trizol utilizado y centrifugar a 12,000 x g, por 10 minutos a una temperatura de 2°-8°C.
- 5.- Eliminar el sobrenadante y lavar el RNA con 1 ml de alcohol al 75% por cada mililitro de Trizol utilizado.
Mezclar con vortex y centrifugar a 7,500 x g, por 5 minutos a una temperatura de 2°-8°C.
- 6.- Secar el botón (no totalmente), agregar agua destilada tratada con DEPC y resuspender.
Incubar por 10 minutos a 55°-60°C y guardar a -70°.

- **Titan One Tube RT-PCR System Roche.**

- 1.- Mantener todos los componentes en hielo.
- 2.- Agitar y centrifugar todos los reactivos antes de preparar las reacciones.
- 3.- Preparar los Master Mix 1 y 2, en tubos separados.

Componentes	Volumen de concentración final para RT-PCR
Master Mix 1	16.5 µl
Aguas tratada con DEPC	
dNTP, 10 mM	
Cebador # I, 20 µl	
Cebador # II, 20 µl	
Muestra RNA, [500 ng]	
Solución DTT, 100 mM	
Master Mix 2	16.5 µl
Aguas tratada con DEPC	
Cebador RT-PCR 5X, con Mg ²⁺	
Enzima Mix	

- 4.- Colocar los Master Mix en un tubo de 0.2 ml de PCR, colocados previamente en hielo, y centrifugar para coleccionar en el fondo. Agregar 30 µl de aceite mineral.
- 5.- Colocar las muestras en un termociclador equilibrado a 50°C e incubar por 30 minutos. Se pueden utilizar temperaturas mayores a los 60°C para la transcripción reversa, para eliminar cualquier estructura secundaria.
- 6.- Ir directamente al termociclador.

Proceso	Temperatura	Tiempo	# de Ciclos
Síntesis de cDNA	50°C	30 min.	1
Desnaturalización de la transcriptasa reversa	94°C	2 min.	1
Desnaturalización del cDNA	94°C	30 seg.	10
Unión	45°-65°C	30seg	
Elongación	68°C	45 seg. – 4 min.	
Desnaturalización	94°C	30 seg.	25
Unión	45°-65°C	30 seg.	
Elongación	68°C	45 seg. – 4 min	
	elongación de	5 seg. por ciclo	
Extensión final	68°C	> 7 min.	1
Preservación	4°C	indefinido	

7.- Por último se corren las muestras en un gel de agarosa de 1-2% para detectar las amplificaciones.

- **Vacuum Blotter, modelo 785; de BIORAD.**

Después de haber corrido las muestras que se desean transferir a la membrana en un gel de agarosa.

- 1.- Cortar membrana y papel filtro (# 3), 0.5 cm más largo que la ventana de plástico por cada lado.
- 2.- Tapar los orificios del gel de agarosa con gel a la misma concentración.
- 3.- Depurar el gel con HCl 0.25 N por 15 minutos en un traste con movimiento lento.
- 4.- Colocar el papel filtro bajo la membrana y después colocar la ventana de plástico sobre estos. El papel filtro y la membrana deben de encontrarse previamente humedecidos con la solución de transferencia.
- 5.- Limpiar el gel con agua destilada para eliminar el HCl y colocar el gel sobre la ventana de plástico. Después se coloca la caja selladora.
- 6.- Ya acomodado todo, se prende la bomba de vacío para verificar que no se escape aire. Se coloca la solución de transferencia (1-1.5 litros), se prende nuevamente la bomba y se deja por 90 minutos a una presión de 5 mm Hg.
- 7.- Cumplidos los 90 minutos se apaga la bomba, se retira el gel (este debe de estar a 1/2 de su área original) y se verifica si quedó DNA en el gel.
- 8.- Mojar la membrana por 5 minutos en SSC 2X y dejar secar entre dos papeles filtro. Después meter la membrana junto con dos papeles filtro a secar a 80°C por 30 minutos.

Realizar la hibridación

- **GLASSMAX DNA Isolation Spin Cartridge System, de GIBCOBRL.**

- 1.- Incubar $\approx 100 \mu\text{l}$ de amortiguador TE ó agua destilada, por muestra a 65°C , para paso 6.
- 2.- Adicionar Nal (yoduro de sodio ó binding solution) a la muestra de DNA 4.5:1.
 - a) Si la muestra de DNA es acuosa, adicionar 4.5 de Nal por cada 1 de DNA (v/v).
 - b) Si la muestra se encuentra en gel de agarosa, entonces se extrae la banda con el DNA y se pesa. En este caso se adiciona 4.5 de Nal por cada 1 de gel con DNA (v/p). Si el DNA fue sometido a electroforesis en amortiguador TBE, se adicionan $20 \mu\text{l}$ de TBE por cada 0.1gr. Calentar la banda del gel en Nal a 50°C hasta que el gel se encuentre totalmente disuelto.
- 3.- Adicionar $600 \mu\text{l}$ de DNA/Nal al cartucho de la centrifuga de Glass Max y centrifugar a $13,000 \text{ g} \times 20$ segundos, vaciar el tubo. Guardar la solución hasta que sea confirmada la recuperación del DNA.
Volúmenes $>$ a los $600 \mu\text{l}$. requieren de más de un ciclo.
- 4.- Adicionar 0.4 ml. de amortiguador de lavado frío (4°C) al cartucho de centrifuga. Centrifugar a $13,000 \text{ g} \times 20$ segundos y eliminar el amortiguador de lavado. Repetir dos veces este paso.
- 5.- Después de remover el amortiguador de lavado del cartucho, centrifugar a $13,000 \text{ g} \times 1$ minutos.

- **DIG-High Prime, de Boehringer Mannheim.**

- 1.- Agregar $1 \mu\text{l}$ de ADN y aforar a $16 \mu\text{l}$ con agua destilada y estéril.
- 2.- Desnaturalizar el ADN hirviéndolo en baño María durante 10 minutos. Enfriar rápidamente en hielo.
- 3.- Agregar $4 \mu\text{l}$ de DIG-High Prime, mezclar y centrifugar brevemente.
- 4.- Incubar por 20 horas a 37°C .
- 5.- Detener la reacción a 60°C durante 10 minutos.

- **Dig High Prime Labeling and Detection Starter Kit, de Boehringer Mannheim.**

Colocar 1 μ l de sonda en 39 μ l de amortiguador de dilución de DNA, este será nuestro tubo # 1.

Diluciones.-

Tubo A.-	10 μ l del tubo 1 en 23 μ l amortiguador de dilución de DNA.
Tubo B.-	5 μ l del tubo 1 en 45 μ l amortiguador de dilución de DNA.
Tubo C.-	5 μ l del tubo A en 45 μ l amortiguador de dilución de DNA.
Tubo D.-	5 μ l del tubo B en 45 μ l amortiguador de dilución de DNA.
Tubo E.-	5 μ l del tubo C en 45 μ l amortiguador de dilución de DNA.

Preparación del método de detección.-

Tubo 1.-	2 ml de amortiguador II
Tubo 2.-	2 ml de solución de anticuerpos.
Tubo 3.-	2 ml de amortiguador I
Tubo 4.-	2 ml de amortiguador III
Tubo 5.-	2 ml de solución de color de substrato.

Después de haber preparado los tubos para la detección, colocar 1 μ l de cada dilución en cada uno de los cuadros marcados (una dilución por cuadro) del Dig quantification test-strip y dejar secar por 2 minutos. Tomar un palillo de control (provisto por el juego de reactivos) y proseguir con el método, introduciendo estos palillos en los tubos de detección.

Método de detección.-

2 min. en tubo 1
3 min. en tubo 2
1 min. en tubo 1
1 min. en tubo 3
1 min. en tubo 4
5-30 min. en tubo 5

Calcular la concentración por medio de las relaciones dadas en el manual de Dig High Prime Labeling and Detection Starter Kit (de Boehringer Mannheim).