



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

“Desarrollo Y Análisis Del Sistema Conjunto PCR/*Dot Blot* Para La
Detección Del Virus De La Necrosis Hipodérmica Y
Hematopoyética Infecciosa”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN ACUICULTURA

Presentada por:

Jonathan Leonidas Castro Lara

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2009

AGRADECIMIENTO

A Dios por dejarme descubrir las maravillas que brinda cada rincón de este mundo.

A mis padres por su cariño y apoyo incondicional y en todo momento.

A todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo, en especial a Javier Robalino, Ph.D. por la dirección del mismo.

A Biogemar S.A. empresa que financió en su totalidad la investigación de esta tesis.

A Marcelo Muñoz, Ph.D. por ser un gran maestro y por el apoyo en las investigaciones realizadas en mi carrera universitaria.

A la Lcda. Irma Betancourt y a José Melena, Ph.D. por su ayuda brindada.

DEDICATORIA

A mi madre Gladys Lara
y a mi abuela Dioselina
Bayas.

A mi hermana Lady
Avellán.

A mis amigas Mariuxi y
Aída.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

M.Sc. Jerry Landívar Z.
PRESIDENTE

Ph.D. Javier Robalino I.
DIRECTOR DE TESIS

Ph.D. Marcelo Muñoz N.
CO-DIRECTOR

Biol. Marcos Álvarez G.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Jonathan Castro Lara

RESUMEN

Enfermedades causadas por virus, entre ellos el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), se encuentran entre los principales causales asociados con la baja productividad en la industria de camarón. La implementación de técnicas de diagnóstico confiables es esencial para mejorar las estrategias de control de dichas enfermedades. El presente trabajo se destinó al desarrollo y análisis de un sistema conjunto de PCR/*dot blot* para la detección del IHHNV. La estrategia experimental se ejecutó en tres fases: 1) clonaje de regiones específicas del genoma viral para la generación de sondas nucleicas contra IHHNV, 2) optimización de un protocolo de PCR/*dot blot* para la detección del virus, y 3) evaluación del método optimizado de diagnóstico PCR/*dot blot* en la determinación de IHHNV en muestras de *Penaeus vannamei*.

Las pruebas de sensibilidad y especificidad realizadas en fragmentos de ADN viral purificado mostraron valores de detección del *dot blot* (sin PCR) de hasta $3^{pg}/\mu l$, y ausencia de falsos positivos. El uso del conjunto PCR/*dot blot* permitió la detección de hasta $0.002^{ag}/\mu l$ de ADN objetivo, comparado con una sensibilidad de $2^{ag}/\mu l$ de la PCR sin *dot blot*.

Este incremento en sensibilidad fue evidenciado durante la aplicación del protocolo PCR/*dot blot* al análisis de muestras de *Penaeus vannamei*. En una población de reproductores analizada, mediante PCR y PCR/*dot blot*, se

encontró resultados positivos para el virus en un 69.83% y 79.9%, respectivamente; mientras que en una población experimental de juveniles los positivos estimados por ambas técnicas fueron 7.48% para PCR y 13.3% para PCR/*dot blot*. A más de incrementar el poder de detección de la PCR, el *dot blot* permitió el diagnóstico inequívoco de un número significativo de muestras cuyo análisis por PCR presentó resultados ambiguos. En base a estos resultados, el uso conjunto de PCR y *dot blot* como técnica de detección viral ofrece mayor sensibilidad y especificidad con respecto al diagnóstico basado solamente en PCR.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ABREVIATURAS.....	X
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. Antecedentes.....	4
1.1 Acuicultura del camarón en el mundo.....	4
1.2 Impacto de las enfermedades infecciosas.....	7
1.3 Principales enfermedades virales que afectan la camaronicultura.....	9
1.3.1 Síndrome de la mancha blanca.....	9

1.3.2 Síndrome de la cabeza amarilla.....	11
1.3.3 Síndrome del enanismo y rostro deformado.....	12
1.3.4 Síndrome de Taura.....	14
1.3.5 Síndrome de la necrosis muscular infecciosa.....	16
1.4 El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV).....	17
1.4.1 Biología molecular del virus.....	18
1.4.2 Epidemiología.....	21
1.5 Métodos de detección de agentes virales.....	24
1.5.1 Métodos de diagnóstico basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
1.5.1.1 PCR simple.....	24
1.5.1.2 Sistema anidado (<i>Nested-PCR</i>).....	28
1.5.1.3 PCR en tiempo real (<i>Real Time-PCR</i>).....	30
1.5.2 Métodos basados en hibridación de ácidos nucleicos.....	34
1.5.2.1 <i>Southern blot</i>	34

1.5.2.2 <i>Dot blot</i>	36
1.5.2.3 Hibridación <i>in situ</i>	39
1.5.3 Inmunodetección.....	41
1.5.3.1 Ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA).....	41
1.5.3.2 <i>Western blot</i>	43
1.5.3.3 Inmunohistoquímica.....	45
1.5.4 Histopatología.....	46

CAPÍTULO 2

2. Materiales y métodos.....	48
2.1 Preparación de la sonda nucleica.....	48
2.1.1 Amplificación de diferentes regiones del genoma de IHHNV	48
2.1.2 Clonaje de regiones amplificadas.....	51
2.1.3 Secuenciación de los clones.....	52
2.1.4 Obtención de la sonda mediante PCR.....	55

2.1.5 Evaluación del marcaje de la sonda con digoxigenina.....	56
2.2 Protocolo básico de <i>dot blot</i>	57
2.2.1 Pre-hibridación.....	57
2.2.2 Hibridación.....	58
2.2.3 Post-hibridación.....	58
2.3 Método de PCR para la detección de IHHNV.....	59
2.3.1 Extracción de ácidos nucleicos a partir de tejido.....	59
2.3.2 Amplificación por PCR.....	60
2.3.3 Electroforesis de productos de amplificación.....	61
2.4 Bioensayos y animales experimentales.....	62
2.4.1 Ensayo con reproductores de <i>P. vannamei</i>	62
2.4.2 Ensayo con juveniles de <i>P. vannamei</i>	63

CAPÍTULO 3

3.RESULTADOS.....	64
3.1 Sondas nucleicas para la detección de IHHNV.....	64

3.1.1 Clonaje y secuenciación de un fragmento del genoma de IHHNV como sustrato para la amplificación de sondas específicas.....	65
3.1.2 Clonaje y secuenciación de regiones específicas del genoma de IHHNV para ser usadas como ADN de control.....	67
3.1.3 Evaluación del marcaje de la sonda con digoxigenina.....	68
3.1.4 Especificidad de la sonda usada en la reacción de dot blot y análisis de la sensibilidad típica de la visualización de los resultados en membrana de nylon y en gel de agarosa.....	69
3.2 Optimización del protocolo de <i>dot blot</i>	72
3.2.1 Evaluación del tiempo y tipo de secado de las membranas de nylon.....	72
3.2.2 Disminución del tiempo de diagnóstico.....	74
3.2.2.1 Protocolo optimizado de <i>dot blot</i>	75
3.2.2.1.1 Pre-hibridación.....	76
3.2.2.1.2 Hibridación.....	76
3.2.2.1.3 Post-hibridación.....	77

3.3 Comparación de algunos parámetros entre la PCR y el conjunto PCR/ <i>dot blot</i>	78
3.3.1 Análisis de la sensibilidad de la PCR y del conjunto PCR/ <i>dot blot</i>	78
3.4 Aplicación del <i>dot blot</i> en los ensayos experimentales para complementar el diagnóstico por PCR.....	80
3.4.1 Análisis de reproductores de <i>P. vannamei</i>	80
3.4.2 Análisis de juveniles de <i>P. vannamei</i>	82

CAPÍTULO 4

4. DISCUSIÓN.....	84
Conclusiones.....	87
Recomendaciones.....	88

Anexos

Bibliografía

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ag	Attogrammo
ARN	Ácido ribonucleico
dNTP	Deoxinucleotido trifosfato
ej.	Ejemplo
kb	Kilobase
µg	Microgrammo
ng	Nanogrammo
NS	Non Structural Protein
ORF	Open Reading Frame
pb	Pares de bases
pg	Picogrammo

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico #1. Principales países productores de camarón desde el año 2003 hasta el 2006.....	6
Gráfico #2. Genoma y organización de los promotores del IHHNV....	20
Gráfico #3. Amplificación por PCR de un fragmento de ADN.....	26
Gráfico #4. Amplificación por la técnica de <i>Nested-PCR</i>	29
Gráfico #5. Resultado obtenido por PCR en tiempo real.....	31
Gráfico #6. Curva estándar del número de copias de IHHNV versus el valor del umbral del ciclo de reacción.....	33
Gráfico #7. Proceso de <i>Southern blot</i>	35
Gráfico #8. Esquema de la técnica de <i>dot blot</i>	38
Gráfico #9. Ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA)	43
Gráfico #10. Regiones amplificadas del genoma del IHHNV durante el presente estudio.....	49

Gráfico #11. Región A, seleccionada para desarrollar la sonda nucleica.....	64
Gráfico #12. Secuencia de la región A.....	67
Gráfico #13. Evaluación de la sonda marcada con digoxigenina.....	69
Gráfico #14. Localización de las regiones G y A en el genoma de IHHNV.....	71
Gráfico #15. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la sonda.	72
Gráfico #16. Determinación del tiempo y tipo de secado de las membranas.....	73
Gráfico #17. Evaluación del tiempo de hibridación.....	75
Gráfico #18. Sensibilidad de la PCR para la detección de IHHNV.....	79
Gráfico #19. Sensibilidad del conjunto PCR/ <i>dot blot</i>	80
Gráfico #20. Clarificación de resultados erróneos de PCR usando el conjunto PCR/ <i>dot blot</i>	82

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla #I. Condiciones de PCR para cada una de las regiones de IHHNV amplificadas en este proyecto.....	50
Tabla #II. Iniciadores utilizados en las diferentes reacciones de PCR para comprobar la existencia del inserto de interés.....	54

INTRODUCCIÓN

En sus inicios, que datan de los años 1970's (1), la acuicultura en el Ecuador se caracterizó por su poco desarrollo tecnológico. Este bajo nivel de tecnología, junto con la creciente intensificación de los cultivos, impulsada por la demanda de los mercados, ha contribuido al surgimiento de problemas asociados con el deterioro de la calidad de agua y suelo, y a la ocurrencia de enfermedades infecciosas. Las epidemias del síndrome de la mancha blanca (WSS) y el síndrome de Taura (TSD) en los años 1990's fueron especialmente negativas por su alto impacto económico en la acuicultura del Ecuador y del mundo (2)(3)(4)(5)(6). Eventualmente, las crecientes pérdidas causadas por éstas y otras enfermedades en la productividad de la industria de camarones, han promovido la implementación de nuevas estrategias, orientadas a minimizar el impacto de los agentes infecciosos.

Es así, como inicia el desarrollo de nuevas tecnologías en la camaronicultura, empezando por la obtención de larvas generadas en laboratorios, reemplazando a las larvas silvestres, que se creían portadoras de enfermedades. Posteriormente, la idea de utilizar reproductores libres de enfermedades, para la producción en laboratorio, de larvas de alta calidad sanitaria, demandó que técnicas de detección de patógenos a nivel molecular fueran introducidas. Una de las técnicas de detección más usadas, hasta la

actualidad, es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica, basada en la multiplicación de un ADN objetivo, tiene una gran aceptación al momento de la selección y control de reproductores, debido a que no es necesario sacrificar al animal para realizar el diagnóstico; mas bien, partiendo de una pequeña muestra de tejido se puede realizar la extracción del material genético y así realizar la detección de un segmento genómico de interés (ej. ADN viral). Sin embargo, la técnica como tal tiene sus limitaciones en términos de sensibilidad y sobretodo especificidad; por lo que es aconsejable su complementación con otras técnicas moleculares.

El presente trabajo busca determinar la factibilidad de la complementación de la PCR con el *dot blot* para la detección del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, conocido como IHHNV por sus siglas en inglés (*Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus*), agente asociado con el Síndrome del Enanismo y Rostro Deformado (RDS). Esta enfermedad, en *Penaeus vannamei*, causa un crecimiento retardado y heterogeneidad de tallas, produciendo una desvalorización económica de la producción. La hipótesis que se pretende evaluar plantea que la incorporación de una técnica para la detección de secuencias virales basada en sondas nucleicas (*dot blot*), como complemento a una detección inicial basada en PCR, resulta en un incremento en la sensibilidad y especificidad en la detección del IHHNV. Estos avances permitirían

establecer estrategias más efectivas y confiables de control de este agente en los sistemas de producción. Además, metodologías similares podrían ser fácilmente aplicables para la detección de otros agentes patógenos del camarón, utilizando algunos de los lineamientos técnicos implementados en el presente trabajo.

CAPÍTULO 1

1. ANTECEDENTES

1.1 Acuicultura del camarón en el mundo

El interés por el cultivo a escala comercial del camarón inicia por la incapacidad de satisfacer, por parte de las pesquerías, el aumento en la demanda del mercado mundial (7). Una de las primeras especies en ser cultivadas a gran escala fue *Penaeus monodon*, en el año de 1968 en Taiwán, ya que tuvo gran aceptación en el mercado japonés (8).

Debido a que la acuicultura tuvo un crecimiento acelerado, se diversificó las especies a cultivar, siendo en Asia las más importantes: el camarón tigre (*P. monodon*), camarón índico (*P. indicus*), camarón banana (*P. merguensis*) y camarón oriental (*P. chinensis*). Mientras que, para las regiones de América Central y Suramérica, las especies más representativas son: el camarón blanco (*P. vannamei*) y el camarón azul o mezclilla (*P. stylirostris*) (7).

En la actualidad, la camaronicultura representa una de las industrias de mayor importancia en el mercado internacional de productos marinos. Según la FAO (9), en el 2006, el comercio mundial de camarón cultivado estuvo avaluado en 12 mil millones de dólares, un valor mayor que aquel estimado para los salmónidos. Los camarones penaeidos de cultivo representan actualmente el segundo grupo más importante de especies acuícolas en el mundo, después de los ciprínidos cultivados a gran escala en Asia. Las especies con mayor representación en el mercado son *P. vannamei*, con más del 60%; y *P. monodon*. Entre los principales países productores de camarón, se encuentran: China, Tailandia, Vietnam, Indonesia, India, México, Brasil, Ecuador, Myanmar y Filipinas (9). Las contribuciones relativas de estos países al mercado internacional de camarón se observan en el gráfico #1.

En lo que respecta al Ecuador, la camaronicultura tiene sus inicios a finales de la década de los 1970's en la provincia de El Oro (1). La producción del crustáceo tuvo un incremento rápido desde sus comienzos, remontando la cantidad de 10000TM en el año de 1980, y llegando a generar 65000TM para el año de 1988. Hasta antes de ese año, Ecuador fue el primer país exportador de camarón, siendo superado en años siguientes por China, país que logró producir 100000TM en el año de 1988 (10).

Principales países productores de camarón

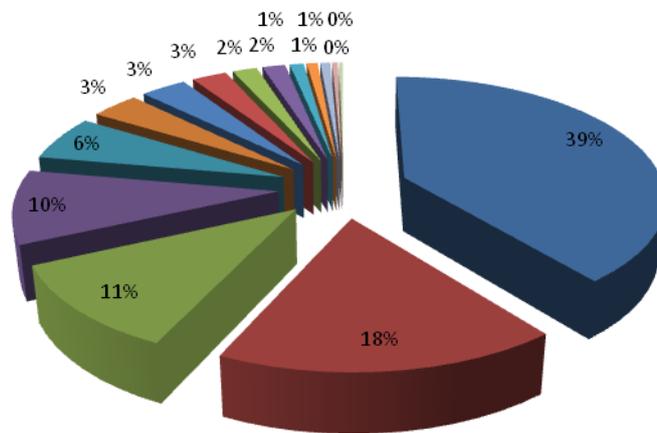
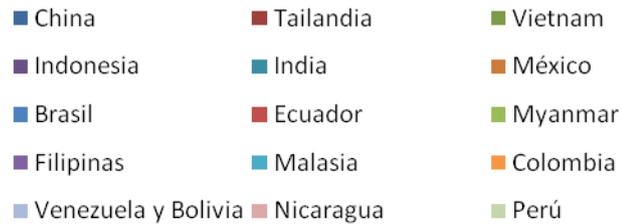


Gráfico #1. Principales países productores de camarón desde el año 2003 hasta el 2006. Los porcentajes indicados representan la contribución relativa de cada país a la producción total de camarón (TM) en el mundo. Fuente: *Fishstat-FAO*.

En la década de los 1990's las exportaciones de camarón, especialmente a Estados Unidos, llegaron a representar el segundo rubro de ingreso económico para el país, superado solamente por las divisas generadas por la explotación petrolera (11). Es en medio de este auge que la industria camaronera sufre su más grande revés, cuando el virus de la mancha blanca ingresa al país y causa pérdidas

catastróficas, a tal punto que la industria se ve prácticamente paralizada (12).

En el 2001 las exportaciones de camarón ecuatoriano (33000TM) generaron 214 millones de dólares en ingresos, marcando el principio de la recuperación de la devastadora epidemia de mancha blanca. Hasta Octubre del año 2008, se exportó un total de 92000TM de camarón, significando un ingreso de 462 millones de dólares para el país. Uno de los mayores importadores de nuestro camarón es el continente europeo, adquiriendo más del 50% de lo exportado; seguido por Estados Unidos, con un 43%; y África, Asia y el resto de América, con un 3.5% (13).

1.2 Impacto de las enfermedades infecciosas

La incidencia de enfermedades infecciosas en la camaronicultura es uno de los factores que más afecta al desarrollo y sustentabilidad de esta industria. Pérdidas cuantiosas asociadas con brotes de patógenos han sido documentadas alrededor del mundo (14). Lundin (1996) ha estimado que durante el año de 1994, el total de pérdidas mundiales como producto de las enfermedades en la camaronicultura bordearon los 3000 millones de dólares, tomando un precio referencial de 5 dólares por kilo.

Uno de los mayores agentes causales de las enfermedades del camarón han sido los virus (16). El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y el virus de la cabeza amarilla (YHV) dejaron, para Asia, una pérdida de alrededor de 1000 millones de dólares por año desde 1994 (17). El WSSV es uno de los virus más devastadores en el cultivo de camarones penaeidos (14), significando una pérdida acumulativa por exportación de 1000 millones de dólares, para los países asiáticos, sólo en los años de 1996 y 1997 (18)(19). Otro virus de importancia a nivel mundial es el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), que para los Estados Unidos causó pérdidas estimadas entre 500 y 1000 millones de dólares para los años comprendidos entre 1981 y 2001 (20).

Otros agentes de importancia comercial incluyen el virus del síndrome de Taura, que causó mortalidades del 50 al 90% de la producción a principios de los 1990's (3). El virus de la necrosis muscular (IMNV), detectado inicialmente en Brasil en el 2002 (21), produjo mortalidades del 20 al 60% (22). El nodavirus de *Penaeus vannamei* (PvNV) detectado en Belice en el 2004, causó una reducción del 50% de la producción en piscinas de granjas afectadas (23).

Estas reveladoras estadísticas hacen que el control de enfermedades infecciosas representen un área prioritaria de desarrollo

tecnológico para la camaronicultura. La implementación de mejores métodos de detección, estrategias de control epidemiológico, mejoramiento genético, bioseguridad, prevención y tratamiento serán esenciales para minimizar el impacto de agentes infecciosos en la productividad camaronera en el futuro.

1.3 Principales enfermedades virales que afectan la camaronicultura

1.3.1 Síndrome de la mancha blanca

La enfermedad de la mancha blanca (WSD) se debe a la ocurrencia del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) que ha afectado a camarones cultivados en casi todas las regiones del mundo (16). El WSSV es caracterizado por su gran virulencia y ha sido responsable de significativas pérdidas en la producción a finales del milenio pasado. El primer evento de esta enfermedad contagiosa se detectó en Japón en 1993 e inmediatamente en otras regiones de Asia (4)(24)(25). Para 1999, la enfermedad ya se encontraba distribuida en Centroamérica y Suramérica, causando los mismos estragos que en los lugares de origen (5)(6). Además, se conoce que el WSSV se encuentra no solamente en camarones penaeidos y no penaeidos, sino que también, en cangrejos, langostas y otros crustáceos (26).

La presencia de manchas blancas, de 0.5 a 2mm de diámetro, en el interior de la superficie del exoesqueleto de los animales moribundos y una coloración rojiza, son signos característicos de la enfermedad (14)(16). A nivel histológico, este virus causa infecciones sistémicas en el camarón, con lesiones producidas a nivel del tejido de origen ectodérmico y mesodérmico, sin afectar el tejido endodérmico (ej. intestino medio y el epitelio hepatopancreático) (27). En los primeros estadios de desarrollo viral, las células afectadas muestran núcleos hipertrofiados, además de una inclusión central acidofílica rojiza rodeada por un anillo azul, basofílico, de cromatina marginada (las coloraciones rojiza, acidofílica; y azulada, basofílica, se obtienen al usar hematoxilina y eosina). Conforme se desarrolla la infección viral, la inclusión central se expande por todo el núcleo hipertrofiado y la región basofílica se incrementa en intensidad (2)(27).

El agente causal se caracteriza por tener una nucleocápside envuelta, y en su interior un ADN circular de doble cadena de aproximadamente 293kb (28). Una de las características morfológicas más notorias del WSSV es un apéndice en una de las terminaciones del virión (29). En los últimos años, este virus fue clasificado como una especie de un

nuevo género: *Whispovirus*, perteneciente a una nueva familia, *Nimaviridae* (30).

1.3.2 Síndrome de la cabeza amarilla

El agente causal de esta enfermedad, el virus de la cabeza amarilla (YHV), fue reportado por primera vez en Tailandia (31), por sospecharse ser el causante de mortalidades masivas en países del sudeste asiático. Poco más tarde, una gran área de la costa Este de India fue afectada por el síndrome de la cabeza amarilla durante los meses de Julio y Agosto de 1994 (32). La enfermedad fue así denominada, debido a que uno de sus signos clínicos es una leve coloración amarilla en el dorso del cefalotórax, producido por la tonalidad amarillenta que el hepatopáncreas hipertrofiado desarrolla como consecuencia de la infección (33).

Las grandes pérdidas causadas por el síndrome de la cabeza amarilla en Tailandia y otros países de Asia, estimularon a inicios de 1996 un programa para desarrollar reservas domésticas de *P. monodon* libres del YHV (34)(35).

Esta enfermedad está asociada con procesos necróticos en el órgano linfoide. Camarones con infección aguda muestran una necrosis severa; las células se observan con una

prominente picnosis nuclear y cariorrexis. Además, se producen cambios degenerativos del órgano linfoide (31)(36)(37). Cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos se observan en hemocitos presentes en el hepatopáncreas, los cuales parecen estar asociados con una respuesta inflamatoria (32).

La necrosis destruye las células parenquimales del órgano linfoide y células del tejido conectivo fibroso. En una necrosis avanzada se observa una marcada eosinofilia y una abundancia de debris necróticos, con restos de núcleos cariorréticos, dando una apariencia de pimienta al órgano linfoide (38).

El agente causal del síndrome de la cabeza amarilla, es un virus de ARN de simple cadena (33); y forma parte del conjunto de virus (6 genotipos) de la cabeza amarilla, siendo el genotipo 1 quien causa la enfermedad (39). El YHV y los demás genotipos, son clasificados como una sola especie dentro del género *Okavirus*, perteneciente a la familia *Roniviridae* (40).

1.3.3 Síndrome del enanismo y rostro deformado

Conocido como RDS por sus siglas en inglés (*Runt Deformity Syndrome*), el síndrome del enanismo y rostro deformado, asociado con la presencia del virus de la necrosis

hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), es una enfermedad que se presenta especialmente en *P. vannamei* y *P. monodon* (41)(42). La relación causal entre infecciones con IHHNV y RDS parece ser complicada, ya que se han reportado múltiples casos de infecciones asintomáticas, así como falta de correlación entre presencia del virus y talla de los animales. En un estudio en particular, se demostró que en juveniles de *P. monodon*, sin signos de la enfermedad, la presencia del virus era alta, y que la mayoría de los camarones tenían tamaños entre 20 y 22cm de longitud, dimensión muy similar a los no infectados con el virus (43). Fenómenos similares han sido notados en *P. vannamei* (Biogemar S.A., trabajos no publicados).

RDS ha sido definida como una enfermedad crónica no letal (44), que resulta en deformidades a nivel cuticular del rostrum, antena, tórax y abdomen, además de una baja tasa de crecimiento (45). Esta disparidad en tallas, puede producir pérdidas económicas del 10 al 50% en comparación con el ingreso producido por lotes libres de RDS (46). Cabe recalcar que, en al menos una especie de camarones penaeidos (*P. stylirostris*), el IHHNV es un agente altamente virulento,

causando altas tasas de mortalidad, tanto en la producción a nivel comercial, como en infecciones experimentales (44).

Las células afectadas por IHNV muestran inclusiones eosinófilas en un núcleo alargado, donde la cromatina se encuentra desplazada hacia los bordes (47); también denominadas como inclusiones de Cowdry del tipo A. Generalmente, las células afectadas son de origen mesodérmico, donde constan el tejido hematopoyético, las glándulas antenales, las gónadas, el órgano linfoide, el tejido conectivo y el músculo estriado; y de origen ectodérmico, que incluyen las branquias, la epidermis cuticular, el epitelio hipodérmico de la parte anterior y posterior del intestino, cordones y ganglios nerviosos (2)(41).

1.3.4 Síndrome de Taura

El síndrome de Taura (TS) fue descrito por primera vez en Ecuador en el año de 1992, en *P. vannamei* localizados cerca de la desembocadura del río Taura (47). Esta es una de las principales enfermedades que afectan a camarones penaeidos, causando un fuerte impacto económico en la industria acuícola (48).

Inicialmente, el TS se atribuyó al uso de fungicidas utilizados por las bananeras de la región para combatir la Sigatoka negra, producida por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*; hasta que Hasson et al. (1995) revelaron un agente viral como causa de la enfermedad de Taura. El agente fue denominado como el virus del síndrome de Taura, conocido como TSV (*Taura Syndrome Virus*), y está ampliamente distribuido en las Américas (50) y en el sureste de Asia, donde ha causado grandes pérdidas (51).

El TSV tiene forma icosaédrica, con un tamaño de partícula entre 31 y 32nm, compuesto de ARN de simple cadena (3). Tiene un genoma viral de 10kb sin incluir la cola poliadenilada. Sus características estructurales y moleculares colocan al TSV dentro de la familia *Picornaviridae* (3), filogenéticamente cercano al patógeno de insectos *Cricket Paralysis Virus* (CrPV)(52).

A nivel histopatológico, la infección produce una necrosis multifocal y difusa en todo el epitelio cuticular del cuerpo (estómago, intestino posterior, branquias y apéndices corporales). Las células infectadas con el TSV muestran un núcleo picnótico y cariorrético, un aumentado citoplasma eosinófilo, lesiones típicas del síndrome que generan una

aparición de pimienta o de perdigón. Además, la infección genera lesiones hemocíticas menalizadas en la cutícula (53)(54).

1.3.5 Síndrome de la necrosis muscular infecciosa

Caracterizado por mostrar necrosis severa en el tejido muscular estriado del camarón y una coloración blanquecina de apariencia opaca en la zona del músculo abdominal, el síndrome de la necrosis muscular infecciosa fue descubierto en Agosto del 2002 en el área costera del estado de Piauí, Brasil (21)(54). En poco tiempo, la enfermedad se distribuyó por los estados de Ceará, Maranhão, Río Grande do Norte, Pernambuco y Paraíba (55).

El agente causal que se relacionó con la enfermedad, fue nombrado como el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV). IMNV es un virus icosaédrico no envuelto, con un diámetro de 40nm; que almacena un ARN de doble cadena de 7560pb, que comprende dos marcos de lectura (ORF por sus siglas en inglés, *Open Reading Frame*). El ORF1 codifica las proteínas de la cápside, mientras que el ORF2 codifica una ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp) (54). En estudios recientes,

basados en el genoma del IMNV, se lo relaciona con los miembros de la familia *Totiviridae* (56).

Histológicamente, la infección muestra una necrosis coagulativa del músculo estriado que puede ser acompañado con edema, infiltración hemocítica y fibrosis (21). El IMNV provoca la enfermedad en *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. monodon* y *Farfantepenaeus subtilis* (22)(57). La tasa de mortalidad provocada por el síndrome de la necrosis muscular infecciosa se encontró entre el 35 y 55% en camarones de 12g, produciendo pérdidas económicas de 20 millones de dólares para el año 2003 (58).

1.4 El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV)

Uno de los primeros virus de camarón identificados en la década de los 1980's, fue el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, conocido por sus siglas en inglés como IHHNV (*Infectious Hipodermal and Hematopoietic Necrosis Virus*) (44)(59). El IHHNV causó alta mortalidad, mayor al 90%, en *Penaeus stylirostris* cultivados en Hawái, convirtiéndose en una de las principales causas de enfermedades conocidas en el cultivo de camarones penaeidos (60). En otras especies comerciales, sobre todo

P. vannamei y *P. monodon*, el IHHNV ha sido asociado con el síndrome conocido como RDS, caracterizado por un crecimiento lento y acumulación de deformidades (41) (42) (45).

En los ítems siguientes se detalla información acerca de la biología molecular y epidemiología del IHHNV.

1.4.1 Biología molecular del virus

El IHHNV tiene una disposición icosaédrica sin envoltura, con un tamaño de 22nm de diámetro, que contiene un ADN lineal monocatenario de 4.1kb (61). Basándose en las características de morfología y genética, el virus se clasifica dentro de la familia *Parvoviridae* (62)(63), y se encuentra estrechamente relacionado con los densovirus pertenecientes al género *Brevidensovirus* (64).

Cerca del 100% de la secuencia genómica del virus se encuentra determinado, incluyendo los tres marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frame*, ORF) (64)(65). Según Tang y Lightner (2002), las secuencias genómicas de IHHNV de animales recolectados entre 1982 y 1997, en Hawái y algunos países del continente Americano, mostraron un bajo nivel de variación.

El ORF1 abarca alrededor del 50% del genoma viral, codificando un producto de 666 aminoácidos; esta región tiene homología con la proteína no estructural 1 (NS-1) de 2 brevidensovirus de mosquito, lo que indicaría la relación filogenética del IHHNV con estos virus que infectan a insectos. En otros virus de esta familia, la NS-1 es requerida para la replicación viral, además tiene gran importancia para la transactivación de dos promotores virales (66). El ORF2 empieza en el nucleótido 534, a 221 nucleótidos del inicio del ORF1; lo que indica que el ORF2 se encuentra dentro del ORF1, pero con diferente marco de lectura. Esta región codifica una proteína de 363 aminoácidos, desconociéndose su funcionalidad; sin embargo, se la relaciona con la NS-2 de otros parvovirus. El ORF3 empieza en el nucleótido 2535, sobreponiéndose en 59 nucleótidos al extremo 3' del ORF1, compartiendo el mismo marco de lectura con éste. El ORF3 codifica una proteína compuesta por 329 aminoácidos (64)(60). Bonami et al. (1990) encontró 4 proteínas estructurales con un tamaño de 74, 47, 39 y 37.5kDa en viriones purificados. Se halló que la proteína de 47kDa era procedente del ORF3, basándose en la secuencia parcial de aminoácidos. Esta observación, junto con la conocida distribución de los genes

estructurales en virus relacionados al IHHNV, sugiere que el ORF3 efectivamente codifica las proteínas estructurales del virus.

Al menos dos promotores han sido identificados en el genoma de IHHNV, y han sido denominados como P2 y P61. Estas regiones regulatorias poseen actividad tanto en células de insectos como en células de peces; y en músculo de camarón, tanto *ex vivo*, como *in vivo* (67). El promotor P2 en IHHNV se encuentra adyacente al ORF1, y presumiblemente regula la expresión de la proteína NS-1, mientras que el promotor P61 regularía la expresión de las proteínas estructurales (64)(67).

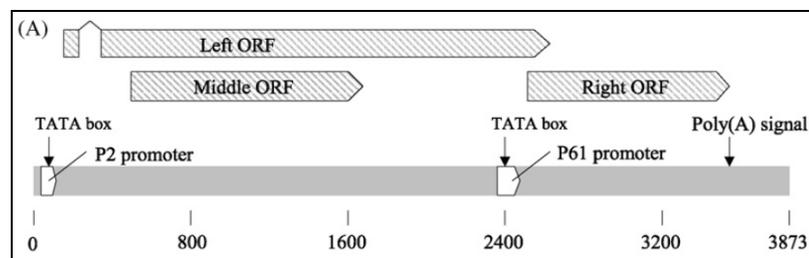


Gráfico #2. Genoma y organización de los promotores del IHHNV. Left ORF, Middle ORF y Right ORF, corresponden a los ORF-1, 2 y 3 descritos en el texto. Tomado de Dhar et al., 2007.

Tang y Lightner (2006) reportaron por primera vez la integración de un segmento del IHHNV dentro del genoma de *P. monodon*, al demostrar que un extremo del virus de 1.9kb formaba parte del ADN del camarón. Esta integración no es inusual en los parvovirus; para citar un ejemplo, el virus

asociado a adenovirus (AAV) es capaz de integrarse en el genoma humano mediante un mecanismo de recombinación no homóloga (69). Esta integración ha sido asociada a estados de latencia. Por esta razón, Tang y Lightner han especulado sobre la posibilidad de una relación entre la integración y la ausencia de reportes de infecciones con IHHNV en África y Australia, lugares de procedencia de los animales en los que se ha observado evidencia de integración.

1.4.2 Epidemiología

El IHHNV se encuentra distribuido en todo el continente Americano (desde Perú hasta México), Oceanía y Asia (Filipinas, Japón, Tailandia, Singapur, Indonesia, Oriente medio, Polinesia Francesa, Nueva Caledonia y Guam) (48)(18).

La infección con IHHNV es fatal para *P. stylirostris* (41); sin embargo, la tasa de mortalidad es baja en *P. vannamei* y *P. monodon*. En estas dos especies el virus es asociado con el síndrome del enanismo y rostro deformado (RDS), que se caracteriza por anomalías en el crecimiento y deformidades cuticulares (45)(42). En ocasiones, juveniles de *P. monodon* no muestran signo alguno del RDS, a pesar de la presencia del

virus (43), lo cual ha sido también observado en *P. vannamei* (Biogemar S.A., trabajos no publicados).

El canibalismo de los animales moribundos es una fuente de transmisión efectiva y rápida del agente viral, aunque también se ha visto una transmisión viral horizontal menos eficiente, a través del agua del estanque (70).

Basándose en el incremento de la prevalencia del virus, luego del primer desove en hembras ablacionadas, se presume que el aumento en la replicación del IHHNV es inducido por el desove; y como resultado la proporción de individuos positivos para el virus se incrementa con el tiempo, en reproductores en cautiverio (71). Además, estudios sobre transmisión vertical indican que hay mayor probabilidad de que ésta ocurra a través de los huevos provenientes de hembras infectadas; y en una menor proporción, a través del esperma de un macho infectado con el virus (71). La presencia del agente viral ha sido documentada en el ovario de hembras que produjeron lotes de post-larvas positivas para IHHNV (43), lo cual es consistente con la hipótesis de transmisión vertical, sobretodo a través de hembras cuyas gónadas hayan sido infectadas.

Aunque es conocida la extremada virulencia del virus en *P. stylirostris*, documentada a inicios de los años 1980's, Morales-Covarrubias et al. (1999) notaron un declive de la mortalidad en poblaciones de *P. stylirostris* expuestas al IHHNV, a inicios del presente milenio. En *P. vannamei*, observaciones anecdóticas parecerían indicar que la relación entre huésped y virus también se ha modificado en poblaciones domesticadas, a tal punto que IHHNV es extremadamente prevalente en ciertas poblaciones comerciales, como por ejemplo en Ecuador (71), sin que se observen brotes significativos de RDS.

En algunos parvovirus se ha asociado la variación de patogenicidad con una sustitución de aminoácidos en las proteínas estructurales (73)(74). En el caso del IHHNV, existe variación genotípica limitada, asociada con distintas zonas geográficas, siendo las regiones más conservadas del genoma aquellas que codifican las proteínas no estructurales, en comparación con las regiones que codifican las proteínas de la cápside (60). Esta inequidad en la distribución de la variación a lo largo del genoma se compara con lo observado en parvovirus de vertebrados (75)(76). Futuros estudios serán necesarios para clarificar la posible relación entre mutaciones en genes estructurales y la posible disminución en la patogenicidad del

IHHNV. Por otra parte, la aparente disminución de la virulencia del IHHNV podría estar asociada con un mejor balance entre el hospedero y el patógeno; o con la selección, natural o artificial, de poblaciones más resistentes o tolerantes al virus (60)(72).

1.5 Métodos de detección de agentes virales

1.5.1 Métodos de diagnóstico basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

1.5.1.1 PCR simple

Esta técnica fue desarrollada en los años 1980's por Kary B. Mullis (77). La PCR permite obtener o amplificar una secuencia de ADN en particular en un número muy elevado de copias (78). También se puede partir con ARN como matriz, siempre y cuando una copia de ADN complementario a éste sea generada primero. El número de copias se incrementa exponencialmente según la cantidad de veces que se repita el ciclo de amplificación. En esta reacción se utiliza una enzima denominada ADN polimerasa termoestable, siendo la más utilizada la *Taq* polimerasa, que debe su nombre a la bacteria termófila de la cual procede (*Thermus aquaticus*) (79).

La PCR consta de tres etapas, la primera es la fase de desnaturalización, donde la doble cadena de ADN a amplificar es separada o desnaturalizada, aplicando altas temperaturas (generalmente se eleva a 95°C). La etapa siguiente se denomina de hibridación, en este periodo los oligonucleótidos se acoplan a una región complementaria del ADN molde, otorgando una pequeña región necesaria de doble cadena, la cual será reconocida por la polimerasa. En esta fase la temperatura óptima es regida según la proporción de cada uno de los dNTP's que forman parte de los *primers*; esta temperatura se encuentra entre 40 y 72°C, por un tiempo de 10 a 60 segundos. La última etapa es llamada fase de extensión, donde la enzima incorpora los dNTP's, complementarios a la cadena de ADN molde, en sentido 5'-3' a partir de los oligonucleótidos. Aquí la temperatura óptima de rendimiento de la enzima se encuentra entre 68 y 72°C, por un tiempo que va a depender del tamaño de la región a amplificar, utilizando 1 minuto por cada 1000 nucleótidos de extensión como regla general (78)(77).

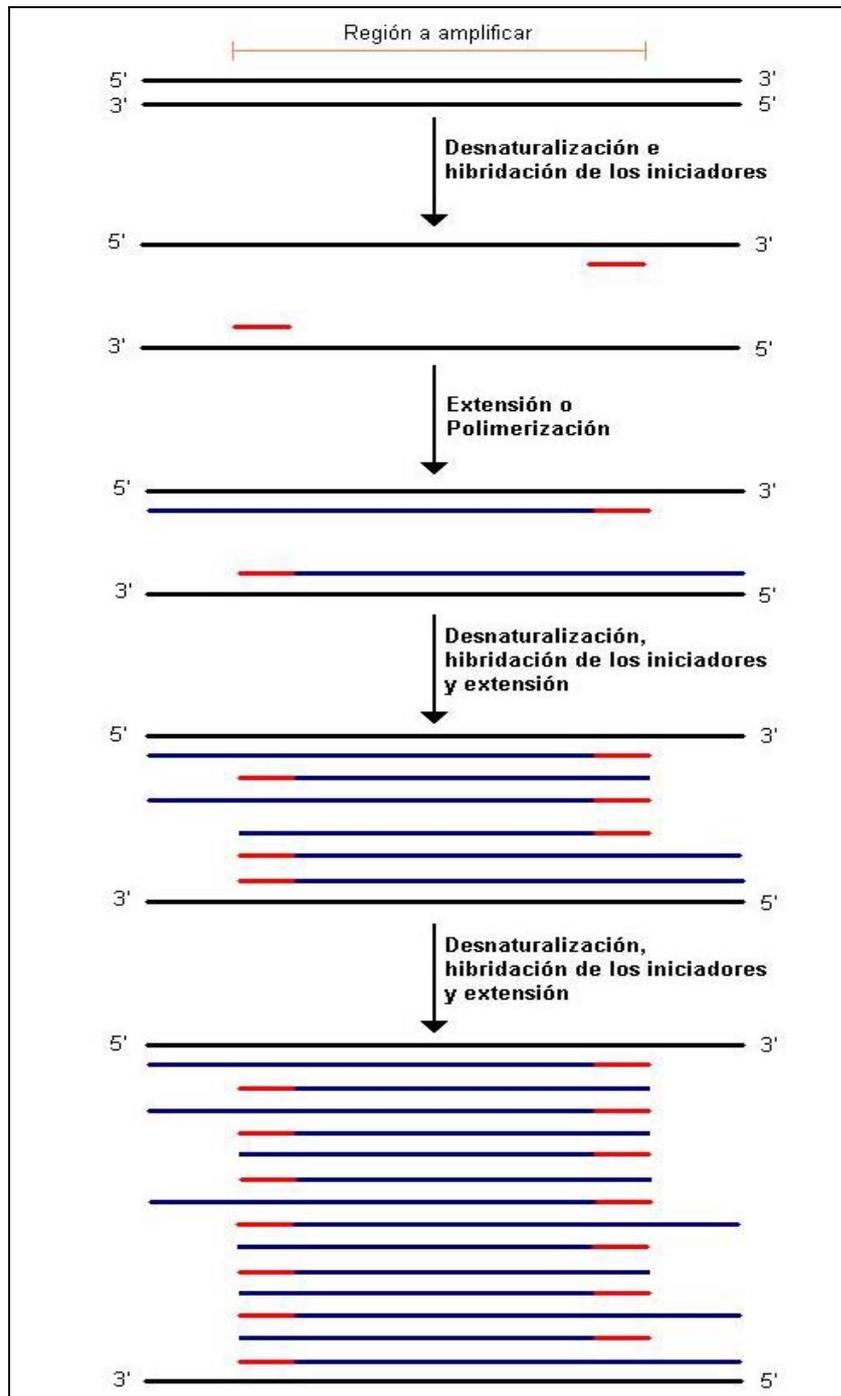


Gráfico #3. Amplificación por PCR de un fragmento de ADN. Tomado de *Biologie Moléculaire*, (1996).

Los productos obtenidos mediante esta técnica son típicamente visualizados en geles de agarosa. El posicionamiento de la banda en el gel está basado en el tamaño del fragmento amplificado. La concentración de agarosa dependerá del tamaño de los productos a migrar. Un gel con alta concentración permitirá una mejor separación de pequeños fragmentos de ADN, mientras que una baja concentración es utilizada para la observación de fragmentos grandes de ADN (78).

El uso de la PCR, en la acuicultura del camarón, tuvo su auge debido a que los productores de camarón tenían problemas de contaminación cruzada en sus granjas, por lo que estas técnicas se empezaron a desarrollar para la identificación de IHHNV y otros patógenos en tejidos de camarón (80)(81). Nunan et al. (2000) indicó una sensibilidad alta de la técnica de PCR para la detección de IHHNV en muestras provenientes de tejido fijado en etanol (70%) o de tejido congelado y de muestras de hemolinfa. En la actualidad, protocolos de diagnóstico basados en PCR han sido reportados y comercializados para la gran mayoría de los patógenos virales conocidos que afectan al camarón, incluidos el

WSSV, TSV, IMNV, Baculovirus *Penaeus* (BP), YHV y otros (65)(82)(83)(12).

1.5.1.2 Sistema anidado (*Nested-PCR*)

Nested-PCR es una modificación de la PCR simple. Prácticamente, se realiza dos reacciones de PCR partiendo de una misma muestra. La única variación es el número de oligonucleótidos iniciadores y el lugar de su hibridación. Para esta técnica son necesarios un primer par de iniciadores (externos) para generar el primer producto de amplificación, que será utilizado como ADN molde para la segunda PCR, que utilizará un segundo par de iniciadores (internos) que se hibridarán en una región específica dentro del primer producto generado. Ver gráfico #4.

El número de ciclos en el ensayo puede variar. En general, la primera reacción se realiza con menor número de ciclos que la segunda reacción.

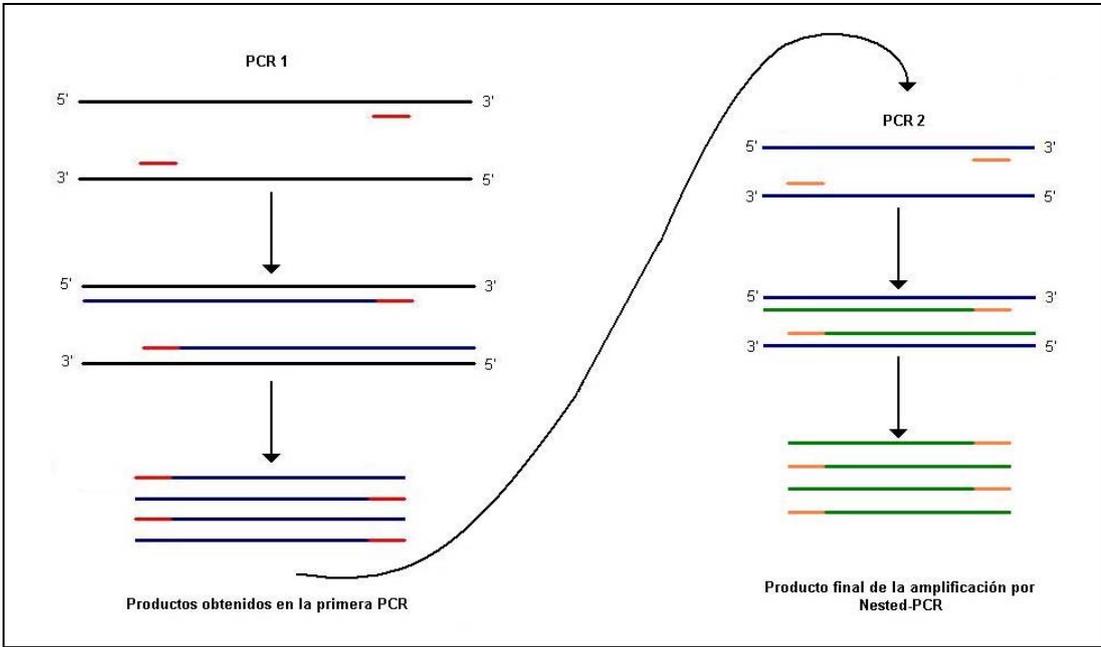


Gráfico #4. Amplificación por la técnica de *Nested-PCR*.

El uso de esta técnica aumenta la especificidad y la sensibilidad en la detección del agente viral; sin embargo, la probabilidad de una posible contaminación crece, debido a la manipulación adicional que se debe realizar durante el proceso. Además, el tiempo y costo del diagnóstico se incrementan debido a la reacción doble que necesita la *Nested-PCR* (84).

Motte et al. (2003) utilizó esta técnica para detectar la presencia del IHHNV en una investigación en donde se documentó evidencia de la transmisión vertical del virus, al encontrar partículas virales en la hemolinfa de hembras infectadas y en nauplios procedentes de éstas.

1.5.1.3 PCR en tiempo real (*Real Time-PCR*)

La PCR en tiempo real tiene el mismo principio que la PCR simple: un par de iniciadores determinan la detección y amplificación de una región de interés. Sin embargo, la visualización del ADN amplificado se realiza durante la reacción misma de PCR, sin efectuar actividad alguna post PCR (ej. geles de electroforesis).

Esto es posible a través del uso de compuestos fluorescentes, con afinidad al ADN de doble cadena, que no interactúan significativamente con el ADN monocatenario.

La cuantificación del ADN sintetizado a medida que se produce la amplificación del blanco, es registrada a través de la acumulación de fluorescencia, dada por la asociación específica entre el compuesto fluorescente y el producto (ver gráfico #5). Así, es posible documentar el rendimiento del proceso de amplificación en tiempo real (85).

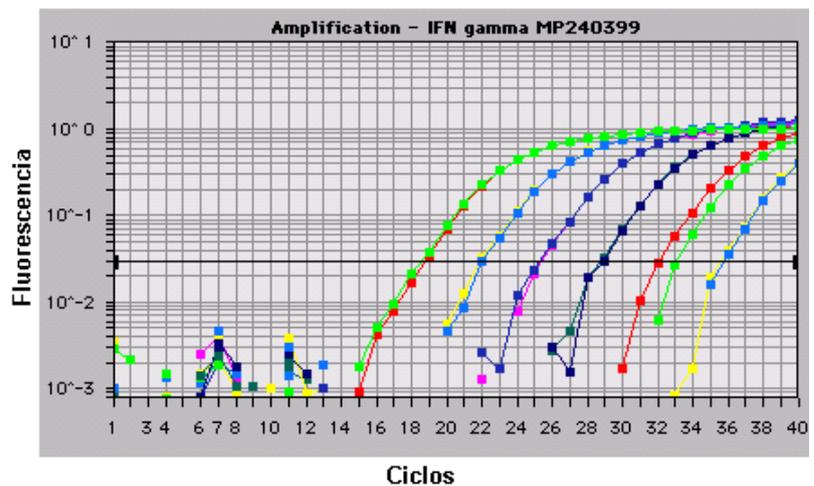


Gráfico #5. Resultado obtenido por PCR en tiempo real. Curvas que describen el incremento en fluorescencia con respecto a los ciclos de amplificación de la PCR. La línea de color negro marca el nivel de amplificación referencial o umbral. Tomado de www.biotech.uiuc.edu.

La relación entre la acumulación del producto de amplificación y el número de ciclos de PCR transcurridos, proporciona la información necesaria para la determinación cuantitativa del sustrato presente en muestras desconocidas. La definición de un valor de fluorescencia referencial (umbral), en el cual la amplificación de todas las muestras a analizar se encuentra dentro del rango lineal de la reacción, permite definir un punto de referencia, en el cual todas las muestras pueden ser comparadas entre sí (ver gráficos #5 y #6). El ciclo de PCR en el cual la acumulación de producto en una reacción alcanza el umbral de amplificación, se denomina Ct. El Ct es el parámetro más importante para comparar la cantidad de producto, y por ende de sustrato, entre diferentes muestras. El gráfico #6 muestra el comportamiento lineal de la función que típicamente relaciona el Ct con el logaritmo de la cantidad de sustrato presente en la reacción. Esta característica de la PCR permite elaborar curvas de calibración mediante la determinación empírica de la relación entre cantidad de sustrato y Ct (el gráfico #6 muestra una de estas curvas de calibración,

determinadas para un ensayo de PCR en tiempo real para la cuantificación de IHHNV (86). Usando este tipo de curvas de calibración, es posible estimar la cantidad de sustrato en una muestra desconocida en base a un Ct observado experimentalmente. Existen métodos variados para la estimación relativa o absoluta de la cantidad de sustrato en base a estos principios (87).

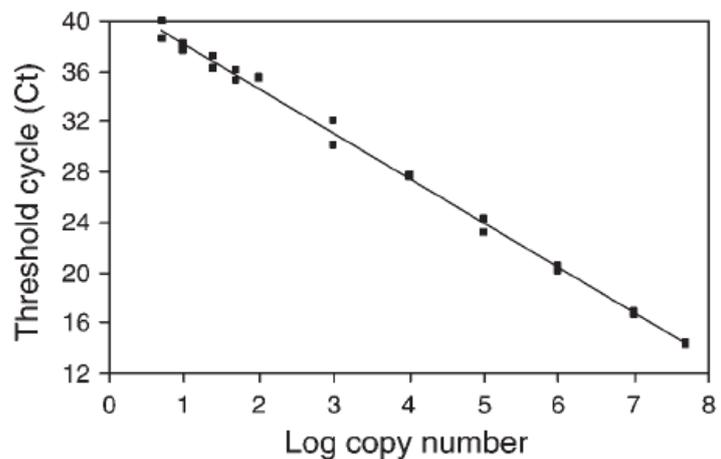


Gráfico #6. Curva estándar del número de copias de IHHNV versus el valor del umbral del ciclo de reacción. Tomado de Tang et al., 2001.

Al momento, algunos protocolos de detección basados en PCR en tiempo real han sido desarrollados para la detección de IHHNV en tejidos de camarón (88)(86). Además, la técnica ha sido utilizada para cuantificar la carga viral en investigaciones de

resistencia inducida para el virus de la mancha blanca mediante una pre-infección con el IHNV en *P. stylirostris* (83), y en *P. vannamei* (12).

1.5.2 Métodos basados en hibridación de ácidos nucleicos

1.5.2.1 Southern blot

Es una de las técnicas que típicamente se utiliza para el análisis organizacional de genes dentro de un genoma. Para esto, el ADN purificado que ha sido procesado mediante digestión usando enzimas de restricción, es separado de acuerdo al tamaño usando electroforesis en geles de agarosa. El ADN separado es transferido del gel de agarosa a un soporte sólido, como filtros de nitrocelulosa o membranas de nylon. Este ADN fijado es desnaturalizado e hibridado por complementariedad usando sondas de un ADN conocido, previamente marcadas. Al ser procesada la membrana, evidencia las bandas correspondientes a los fragmentos de ADN hibridados con la sonda. Según el número y el tamaño de las bandas encontradas es posible localizar un ADN específico con un contexto de sitios de restricción (78)(89).



Gráfico #7. Proceso de *Southern blot*. Tomado de *Fundamentals of Molecular Biology*.

El marcaje de las sondas con radioactividad y la visualización de los resultados por autoradiografía corresponden al método clásico para detectar secuencias de interés. En la actualidad también existen opciones de marcaje basados en nucleótidos ligados covalentemente a un antígeno, el cual es posteriormente detectado a través de anticuerpos ligados a una enzima, que producen una reacción colorimétrica como resultado de la hibridación.

El principio del *Southern blot* puede también ser utilizado en la detección de agentes patógenos virales. Esta técnica puede ser utilizada por sí sola para detectar ADN viral en el contexto de ADN genómico total del huésped, o también como complemento a la detección por PCR para detectar productos de amplificación específicos mediante hibridación de las

sondas. En este último caso, el ADN es obtenido mediante PCR antes de ser depositado en el gel de agarosa.

Debido a que el *Southern blot* es una técnica más elaborada, demanda de mayor tiempo que otros métodos de detección molecular, por lo que es raramente aplicada para realizar diagnóstico rutinario de patógenos.

1.5.2.2 *Dot blot*

Dot blot es una técnica, que al igual que *Southern* y *Northern blot*, es de alta sensibilidad y especificidad. Se utiliza en la detección de una región de ADN de interés, para lo cual se deposita directamente el ADN sobre la membrana de nylon y se desnaturaliza ya sea de forma química (NaOH) o física (temperatura). Luego, se utiliza una sonda de ácidos nucleicos, que generalmente se marca con digoxigenina, biotina u otra molécula posteriormente detectable.

La sonda marcada se hibrida por complementariedad al ADN fijado en la membrana. A su vez, la digoxigenina o molécula marcadora es

reconocida por un anticuerpo conjugado a una enzima (ej. fosfatasa alcalina) u otra molécula detectora, que depende del tipo de molécula marcadora que se haya utilizado. Típicamente se produce una reacción colorimétrica ante la adición de un sustrato específico para la enzima conjugada a la molécula detectora, revelando la existencia del segmento de ADN de interés en la muestra (90).

Otras opciones de revelado incluyen el uso de sustratos quimioluminiscentes y fluorescentes. El gráfico #8 muestra un esquema del procedimiento y principios del *dot blot*.

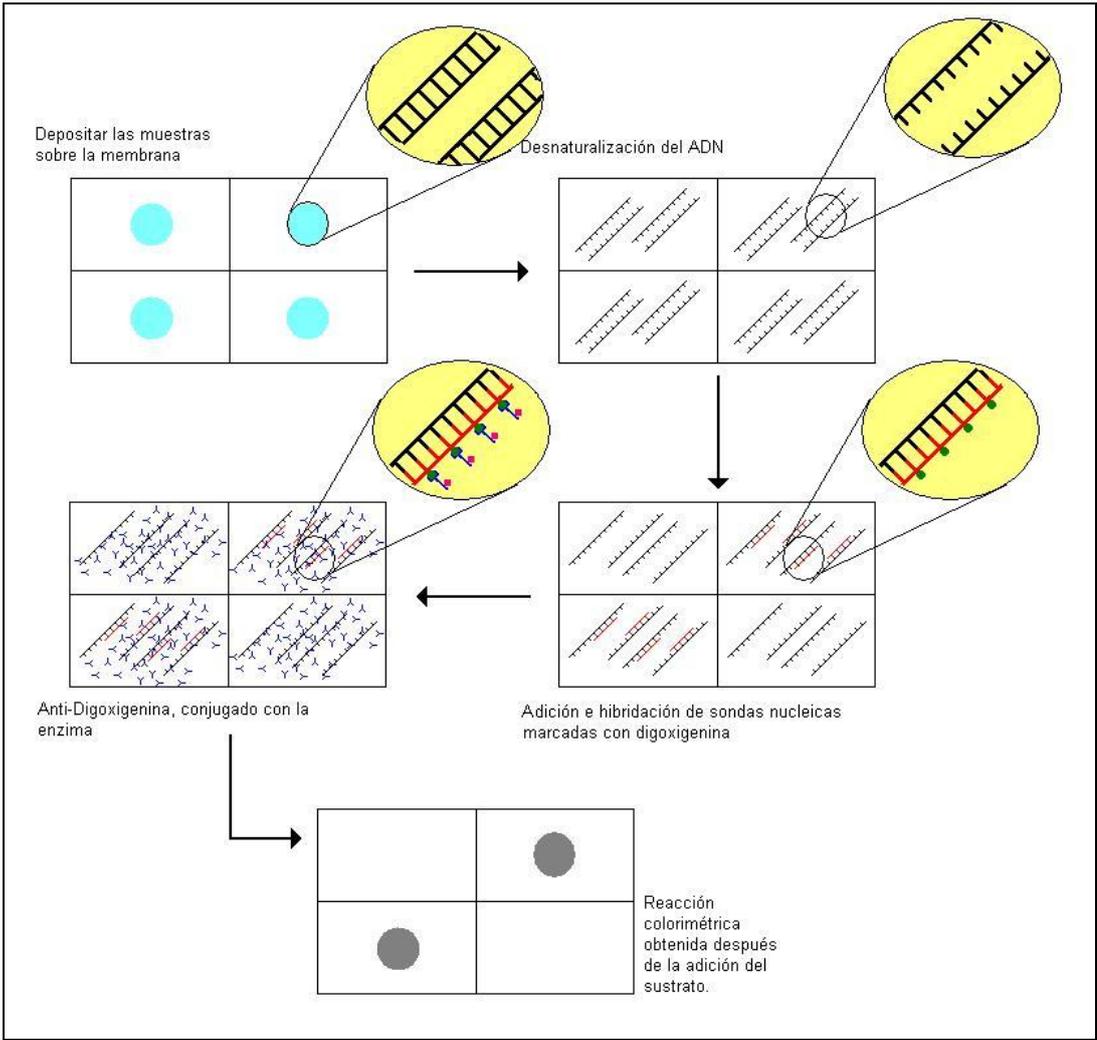


Gráfico #8. Esquema de la técnica de dot blot.

1.5.2.3 Hibridación *in situ*

La reacción de hibridación de la sonda marcada en esta técnica, a diferencia de las técnicas mencionadas en los ítems anteriores, se realiza directamente sobre los tejidos (*in situ*), sin tener que realizar una extracción previa de ADN. Sin embargo, es necesario realizar un procesamiento extensivo de los tejidos previo a la detección, utilizando técnicas histológicas.

A través de elevada temperatura, entre 85 y 90°C, o variando extremadamente el pH, se logra la desnaturalización del ADN dentro de la célula. Cuando se agrega la sonda marcada, se restituye gradualmente la temperatura o el pH. Así, la sonda hibrida de forma complementaria en el ADN celular. La adición de un sustrato revela la hibridación o no de la sonda, de forma conceptualmente similar a lo ya descrito en las secciones anteriores (91).

La hibridación *in situ* se utiliza especialmente para reconocer el sitio de acción de algunos genes dentro de la célula, mediante la localización del ARN mensajero (ARNm). Inicialmente se elimina el ADN celular con

ADNasas, dejando como único material genético a los ARN, para luego añadir una sonda de ADN o ARN marcada, complementaria al ARNm que se pretende localizar (91).

Gracias a que la técnica indica el sitio en que se encuentra el material genético de interés, se utiliza en el contexto del diagnóstico para hallar el sitio de acción de agentes virales. Por ejemplo, sondas específicas de ADN se han utilizado para detectar IHNV, obteniendo resultados positivos en juveniles de *P. monodon* y *P. vannamei*, que habían sido positivos para IHNV por PCR. Estos estudios han revelado que tejidos infectados por el virus incluyen células de la glándula antenal, branquias, tejido hematopoyético, corazón y tejido conectivo en órganos como el hepatopáncreas (47). Además, la hibridación *in situ* tiene la ventaja de poner en evidencia la localización de un virus en el contexto de lesiones histopatológicas e incluso dar información acerca de la distribución sub-celular del agente viral.

1.5.3 Inmunodetección

1.5.3.1 Ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA)

El ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima, más conocido como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) es una técnica cuantitativa basada en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una base sólida, por medio de anticuerpos (92).

El complejo anticuerpo-enzima se fija a una proteína o antígeno específico. Luego es adicionado el sustrato necesario para producir una reacción colorimétrica, que es cuantificada por medio del espectrofotómetro. Los lectores que se utilizan para estas cuantificaciones, cuentan con sistemas de filtros que permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda (93).

Existen tres clases de ensayos de este tipo, ELISA directo, en el cual el antígeno es reconocido por el conjunto anticuerpo-enzima; para luego generar la respectiva coloración. Por otro lado, ELISA indirecto emplea dos anticuerpos, uno que reconoce al antígeno

de interés, y el segundo que reconoce al primer anticuerpo. Este segundo anticuerpo es el que está ligado a una enzima que producirá la reacción colorimétrica.

Por último, el ELISA sándwich permite la cuantificación y detección del antígeno, debido a que el antígeno se deposita sobre una base de anticuerpos específicos para él. Luego, otro anticuerpo (marcado) que también será específico para el antígeno de interés, es adicionado y generará el color que se leerá en el espectrofotómetro. En ELISA tipo sándwich, la detección del segundo anticuerpo específico puede ser también indirecta, es decir, utilizando un tercer anticuerpo ligado a la enzima de detección (92)(93).

ELISA tiene una gran aceptación en las áreas donde se precisa de la cuantificación de productos mediante anticuerpos, como son: el diagnóstico clínico, detección viral y búsqueda de anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, Intorasoot et al. (2007) usó esta técnica en su estudio para demostrar y caracterizar la presencia de una glicoproteína del virus de la cabeza amarilla usando anticuerpos específicos. Así mismo, Liu

et al. (2002) se basaron en la detección de antígenos de WSSV (proteína de 28kDa) usando anticuerpos específicos monoclonales para este virus.

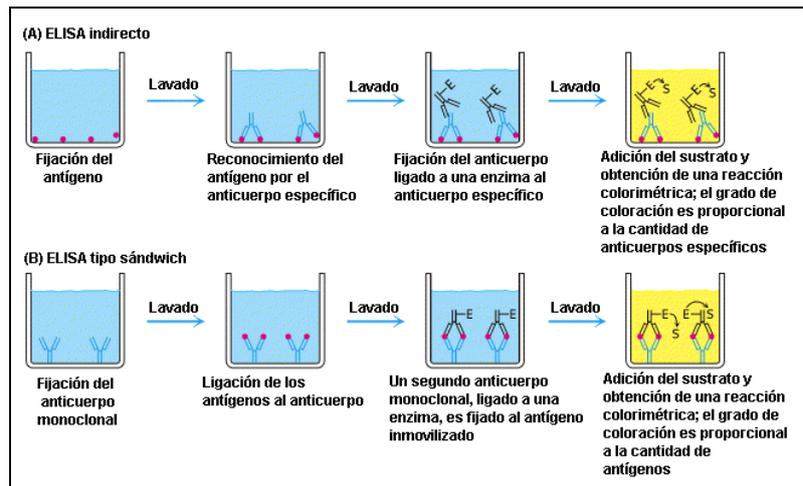


Gráfico #9. Ensayo de inmunoadsorción ligado a una enzima (ELISA). (A) ELISA indirecto y (B) ELISA tipo sándwich. Tomado de Janeway et al. (2001).

1.5.3.2 Western blot

El análisis de *western blot* es utilizado para la identificación de proteínas que son inmunorreactivas a un anticuerpo específico. Las proteínas son separadas mediante electroforesis en geles de *Sodium dodecyl sulphate-poliacrilamida* (SDS-PAGE) (91). Además, *western blot* puede ser usado para una proyección de los cambios de expresión de una proteína en diferentes condiciones (96).

El tejido sometido al análisis es homogenizado y las proteínas de dicho tejido se separan en los geles durante la electroforesis (en base a su peso molecular), visualizándose en bandas. La capacidad migratoria de las diferentes proteínas en SDS-PAGE está dada fundamentalmente por su peso molecular, ya que moléculas de SDS (con carga negativa) desnaturalizan las proteínas y confieren a los polipéptidos una carga neta negativa uniforme a lo largo de la cadena de aminoácidos (91). Finalmente, las bandas se transfieren a membranas de nitrocelulosa, nylon u otros compuestos sintéticos; las cuales se incuban con anticuerpos específicos para la proteína que se desea localizar; y que servirá como sustrato para la fijación de un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa u otra enzima reveladora. El revelado es mediante un agente quimioluminiscente o cromogénico, que pone en evidencia a la proteína que reaccionó frente al anticuerpo específico (91)(96).

La técnica ha sido utilizada en estudios de detección del virus del síndrome de la mancha blanca, (97), YHV y otros.

1.5.3.3 Inmunohistoquímica

Este tipo de técnicas, al igual que las mencionadas anteriormente, son pruebas que utilizan anticuerpos como reactivos específicos para evidenciar un producto de interés (91). Tiene como principio la detección de antígenos sobre cortes histológicos a través de anticuerpos monoclonales o policlonales (98).

La inmunohistoquímica es uno de los métodos más directos para la identificación de la distribución, sea celular como subcelular, de una proteína. En el caso de la detección de agentes virales, de manera similar a la hibridación *in situ* de sondas nucleicas, la inmunohistoquímica permite observar la distribución de antígenos virales en diferentes tejidos y compartimientos extra e intracelulares. La detección *in situ* de virus a través de anticuerpos requiere, además, un procesamiento relativamente extenso de las muestras, resultando en un tiempo de detección más largo que otros métodos de diagnóstico molecular.

La inmunohistoquímica fue desarrollada y aplicada usando anticuerpos monoclonales para detectar el virus

del síndrome de la mancha blanca (99). Además, la técnica ha sido utilizada en estudios relacionados con la detección del virus del síndrome de Taura, donde Erickson et al. (2005) analizaron una variación del virus proveniente de camarones cultivados en Belice.

1.5.4 Histopatología

La histopatología se basa en la observación al microscopio de cortes histológicos previamente teñidos. La tinción más usada es la hematoxilina y eosina, que comprende la exposición de la muestra a un colorante basofílico (hematoxilina) y a un colorante acidofílico (eosina). La doble tinción tiene como objeto la generación de contraste entre estructuras en el tejido, para facilitar la observación y resolución de estructuras a nivel histológico.

Las anomalías histopatológicas asociadas con diferentes agentes infecciosos, y reveladas a través de técnicas histológicas, permiten en muchas ocasiones el diagnóstico diferencial de enfermedades, aún sin conocer las características moleculares del agente causal. Además, este tipo de observación puede revelar eventos celulares asociados con el proceso patológico, tales como infiltración de células

inmunitarias, hipertrofia celular o de compartimientos subcelulares, procesos necróticos, formación de cuerpos de inclusión, y otros. Estos métodos han permitido comprender mejor muchas de las enfermedades que afectan a la camaricultura, incluidas aquellas causadas por virus como el IHHNV, WSSV, TSV, YHV (23)(32)(38)(43)(47)(54)(82)(83)(100)(101).

La histopatología ha sido una de las técnicas con mayor trayectoria en el diagnóstico y estudio del IHHNV. Tang et al. (2003a) estudiaron las características de la infección del IHHNV con aislados obtenidos en varias regiones del mundo, para analizar una posible variación de la enfermedad según el origen geográfico del virus. Además, Tang et al., (2003b) en su investigación acerca de la resistencia inducida contra el virus del síndrome de la mancha blanca al pre-infectar con el IHHNV a ejemplares de *P. stylirostris*, hizo uso de la histopatología para confirmar los estragos de los agentes virales. Del mismo modo, se usó la técnica en un trabajo para identificar las distintas respuestas que producía el IHHNV en *P. monodon* y *P. vannamei* (47).

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación de la sonda nucleica

2.1.1 Amplificación de diferentes regiones del genoma de IHHNV

Mediante PCR se amplificó varias regiones del genoma del virus (número de acceso en el *GenBank* AF218266), de las cuales una región (A) se seleccionó para generar la sonda que se utilizó en el ensayo de *dot blot*, y las 6 regiones restantes (B, C, D, E, F y G) se destinaron para controles negativos del mismo ensayo.

La región A fue amplificada con los iniciadores 5'-AATTC GACGCTGCCAATGAT-3' y 5'-GCCAATGTTACGTCGGCTTC 3', los cuales producen un segmento de 345pb. La región B se obtuvo con los iniciadores 5'-CGACTGGCAACAGATCTTCA-3' y 5'-AAGTGACGGCGGACAATATC-3', generando una región

de 465pb, mediante PCR simple. La región C (465pb) y D (323pb) fueron obtenidas mediante *Nested-PCR* utilizando iniciadores externos 5'-CGACTGGCAACAGATCTTCA-3' y 5'-AAGTGACGGCGGACAATATC-3', región C; e iniciadores internos 5'-GAAGTACGACTCCCACCACA-3' y 5'-CTGACGATAGGGATTTTAGTC-3', región D. Utilizando los iniciadores 5'-GGAAGTGTTGGAAACAGTAAT-3' y 5'-TTCGTATTTTGGTCTTGGCC-3', se obtuvo la región E de un tamaño de 637pb. La región F se amplificó con los iniciadores 5'-GGAAGTGTTGGAAACAGTAA T-3' y 5'-GCTCTGGCAGCAA AGGTAAC-3', para un segmento de 535pb. Por último, la región G se obtuvo con los iniciadores 5'-TAATGAAGACGAAGAACACGCCGSSGG-3' y 5'-TGGGTAAGTACTAGGTTTCCAAGGGATGGTT-3', produciendo un fragmento de 702pb. Ver gráfico #10.

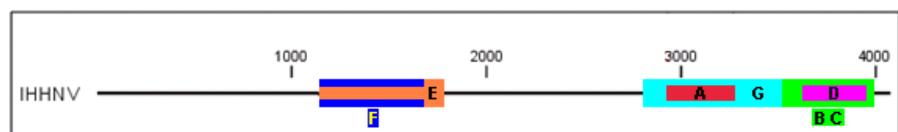


Gráfico #10. Regiones amplificadas del genoma del IHHNV durante el presente estudio.

Las condiciones en que se realizaron las diferentes reacciones de PCR fueron las siguientes: iniciadores (0.5µM de cada uno), dNTPs (0.2mM), *Taq* (Invitrogen) polimerasa

(2.5U/50µl), MgCl₂ (1.5mM), en 1x búfer PCR (20mM Tris-HCl pH8.4, 50mM KCl). Un volumen de 1µl de ADN molde fue utilizado por cada 20µl de volumen de reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo bajo las condiciones detalladas en la tabla #I. Luego, las muestras se mantuvieron a 4°C hasta ser retiradas del termociclador para su siguiente proceso.

	Regiones A y E		Regiones B y C		Región D	
	T (°C)	Tiem.	T (°C)	Tiem.	T (°C)	Tiem.
Desnaturali. inicial	95	3min	95	5min	95	5min
Desnaturalización	95	30s	95	30s	95	30s
Hibridación	58	30s	59	45s	62	45s
Polimerización	72	1min	72	45s	72	45s
Polimerizac. final	72	3min	72	3min	72	3min
Ciclos	41		31		36	
	Región F		Región G			
	T (°C)	Tiem.	T (°C)	Tiem.		
Desnaturali. inicial	95	5min	95	5min		
Desnaturalización	95	30s	95	30s		
Hibridación	61	45s	60	45s		
Polimerización	72	45s	72	45s		
Polimerizac. final	72	3min	72	3min		
Ciclos	30		40			

Tabla #I. Condiciones de PCR para cada una de las regiones de IHNV amplificadas en este proyecto.

Se usó electroforesis en geles de agarosa para la visualización de los fragmentos amplificados. La cantidad necesaria de agarosa fue pesada y mezclada en búfer 1x TAE (40mM Tris, 5mM NaOAc, 0.77mM EDTA), para luego ser

calentada en un microondas. Se utilizaron los 20µl de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio, y migrado en búfer 1x TAE. Se utilizó un marcador de peso molecular de fabricación casera donde se evidencian bandas de distintos tamaños (1040, 702, 505, 345 y 255pb).

Las bandas visualizadas fueron cortadas del gel de agarosa, depositadas en tubos de 1.7ml y almacenadas (por pocas horas) a 4°C hasta realizar la extracción del ADN. Para extraer el ADN del gel de agarosa se utilizó el kit *QI Aquick Gel Extraction* (QIAGEN), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

2.1.2 Clonaje de regiones amplificadas

Los fragmentos amplificados fueron clonados usando el kit *TOPO TA Cloning*, (Invitrogen). Se procedió de acuerdo a una modificación del protocolo original del kit: 0.5µl del vector (*pCR[®]4-TOPO[®]*) de 3956pb, 0.5µl de solución salina (12M NaCl, 0.06M MgCl₂) y 2µl de ADN. Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se descongeló muy lentamente las bacterias (*One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E. coli*, del mismo kit) almacenadas a -80°C. Enseguida, se colocó 25µl de bacterias a cada tubo de

reacción que se dejó incubando con el plásmido vector. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo.

Para realizar la transformación se produjo un choque térmico para lo cual se trasladaron los tubos (incubados en hielo) rápidamente a 42°C durante 50 segundos. Luego se los devolvió al hielo durante 1 ó 2 minutos. Después de este tiempo se adicionó 200µl de medio de cultivo S.O.C. (Tryptona 2%, extracto de levadura 0.5%, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄ y 20mM glucosa), y se incubó a 37°C con agitación constante durante 1 hora. Por último, las células fueron sembradas en placas con medio LB agar (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y agar-agar 1.4%) autoclavado a 20psi durante 15 minutos y suplementado con ampicilina a una concentración de 100^{µg}/ml, incubándose a 37°C entre 16 y 24 horas para visualizar las colonias.

2.1.3 Secuenciación de los clones

Se tomaron 10 muestras (por cada inserto clonado) de colonias obtenidas en las placas con medio LB agar con ampicilina. Estas colonias fueron sembradas en tubos de 1.7ml con 1ml de medio de cultivo LB con ampicilina 100^{µg}/ml, e incubadas a 37°C durante 6 horas. Para confirmar la presencia del inserto se realizaron diferentes PCRs con los iniciadores

que se utilizaron para obtener cada uno de los fragmentos clonados y en condiciones similares a las descritas en la sección 2.1.1. para cada uno de ellos, con la particularidad de que se usó como fuente de ADN molde 1µl de bacterias recuperadas en los tubos de 1.7ml.

De los clones seleccionados como recombinantes mediante PCR, se re-inocularon (con 100µl del cultivo inicial) 3 clones para cada uno de los insertos A, B, C y D; y 1 clon para cada uno de los insertos E y F, en tubos con 2ml de medio LB con ampicilina a 100^{µg}/ml. Estos tubos se incubaron a 37°C, con agitación durante toda la noche, para la extracción del plásmido.

Para la extracción del plásmido vector, se utilizó el kit *Rapid Plasmid Isolation - Minipreps Scale (<40ug)*, (Invitrogen), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

En este punto, se realizaron varias pruebas de PCR para confirmar la presencia del fragmento clonado en ADN plasmídico purificado, utilizando las condiciones descritas en la sección 2.1.1. y los iniciadores indicados en la tabla #II. Las muestras seleccionadas en base a estas pruebas confirmatorias fueron secuenciadas por Macrogen Inc. (Corea del Sur).

	Primer 1	Primer 2	Muestras analizadas
PCR 1	T3 priming site* 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'	T7 priming site* 5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'	A5N A5R A15 B8N B8R B11 C4N C4R C11 D7N D7R D13 E5 F1
PCR 2	5'-AATTCGACGCTGCCAATGAT-3'***	T3 priming site* 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'	A5N A5R A15
PCR 3	5'-GCCAATGTTTACGTCGGCTTC-3'***	T3 priming site* 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'	A5N A5R A15
PCR 4	5'-CGACTGGCAACAGATCTTCA-3'***	M13 Reverse priming site* 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	B8N B8R B11 C4N C4R C11
PCR 5	5'-AAGTGACGGCGGACAATATC-3'***	M13 Reverse priming site* 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	B8N B8R B11 C4N C4R C11
PCR 6	5'-GAAGTACGACTCCCACCACA-3'***	M13 Forward (-20) priming site* 5'-CATTTTGCTGCCGGTC-3'	B8N B8R B11 C4N C4R C11 D7N D7R D13
PCR 7	5'-CTGACGATAGGGATTTTAGTC-3'***	M13 Forward (-20) priming site* 5'-CATTTTGCTGCCGGTC-3'	B8N B8R B11 C4N C4R C11 D7N D7R D13
PCR 8	5'-GGAAGTGTTGGAACAGTAAT-3'***	5'-GGCCAAGACCAAATACGAA-3'***	E5
PCR 9	5'-GGAAGTGTTGGAACAGTAAT-3'***	5'-GCTCTGGCAGCAAAGGTAAC-3'***	F1

Tabla #II. Iniciadores utilizados en las diferentes reacciones de PCR para comprobar la existencia del inserto de interés. *Iniciadores que son parte del kit *Rapid Plasmid Isolation - Minipreps Scale (<40ug)*, (Invitrogen). ** Son iniciadores utilizados para generar los productos que fueron clonados.

2.1.4 Obtención de la sonda mediante PCR

La sonda de ADN fue marcada con *Digoxigenin-11-dUTP* (Roche) mediante PCR. Se utilizaron los mismos iniciadores que se usaron para generar la región A: 5'-AATTCGACGCTGC CAATGAT-3' y 5'-GCCAATGTTACGTCCGGCTTC-3'.

La reacción de PCR se produjo bajo los siguientes parámetros: iniciadores (0.5 μ M de cada uno), dNTPs (0.2mM de dCTP, dGTP y dATP; 0.130mM de dTTP y 0.07mM de UTP-11-DIG), *Taq* (Invitrogen) polimerasa (2.5U/50 μ l), MgCl₂ (1.5mM), en 1x búfer PCR (20mM Tris-HCl, 50mM KCl). El ADN (plásmido conteniendo la región A secuenciada anteriormente) utilizado en la PCR fue previamente diluido a razón 1:300. De la dilución, un volumen de 1 μ l fue utilizado por cada 20 μ l de volumen de reacción de PCR. La mezcla de reactivos fue desnaturalizada a 95°C por 3 minutos en un termociclador. Luego se realizó 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C por 30 segundos; hibridación a 58°C por 30 segundos; y polimerización a 72°C por 1 minuto. Al finalizar el último ciclo, las muestras fueron polimerizadas a 72°C por 3 minutos y luego almacenadas a 4°C.

El producto amplificado marcado con digoxigenina (sonda) fue resuelto en agarosa al 1.2% y purificado utilizando el kit *QI-Aquick PCR purification* (QIAGEN), antes de ser utilizado en pruebas de hibridación.

2.1.5 Evaluación del marcaje de la sonda con digoxigenina

La incorporación de *Digoxigenin-11-dUTP* (Roche) en la sonda fue evaluada al realizar una reacción de *dot blot* utilizando sondas marcadas y sondas sin marcar; para luego someter dichas membranas al proceso de revelado detectando así la presencia de digoxigenina asociada al producto de amplificación. Las membranas fueron secadas al ambiente, luego equilibradas en TBS (12mM Tris-Cl pH 7.5, KCl 0.02%; NaCl 0.8%), e incubadas en 5% leche descremada diluida en TBS, con el fin de bloquear posibles sitios de interacción inespecífica. La sonda fue detectada incubando con anticuerpos *Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments* (Roche), marcados con fosfatasa alcalina (0.05 U/ml). Esta interacción se reveló al añadir el sustrato cromogénico insoluble *BM Purple AP Substrate precipitating* (Roche).

2.2 Protocolo básico de *dot blot*

2.2.1 Pre-hibridación

La membrana de nylon es cortada al tamaño necesario, y colocada sobre papel aluminio. Esta es marcada con un lápiz para saber su orientación y por ende la de las muestras. Entre 0.5 y 1µl de cada muestra a analizar es depositado en la membrana. Esta membrana se deja secar durante 3 horas. Si se desea se puede almacenar en papel aluminio a 4°C hasta su procesamiento.

La membrana es humedecida en solución 2x SSC (0.75M NaCl, 75mM Citrato de Sodio $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$). Enseguida la muestra es desnaturalizada al sumergir la membrana en solución 1 (0.5M NaCl, 0.2N NaOH) durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se sumerge en solución 2 (1M NaCl, 0.5M Tris-Cl pH 8.0) durante 10 minutos, para neutralizarla. Luego, la membrana es colocada en una funda plástica con cierre hermético, agregando solución de hibridación Church-Gilbert (0.34M Na_2HPO_4 , 0.16M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, SDS 7.5%, 1mM EDTA, pH 7.2) durante 60 minutos a 65°C.

2.2.2 Hibridación

La sonda nucleica es llevada a 95°C durante 5 minutos, para la desnaturalización de la doble cadena. Se descarta la solución de hibridación y se coloca nueva solución de hibridación. En este momento, se adiciona a la membrana la sonda inmediatamente después de haberla calentado. La membrana se deja hibridar a 65°C durante toda la noche (entre 16 y 24 horas).

2.2.3 Post-hibridación

La membrana es transferida de la funda plástica a un recipiente, donde se sumerge en solución 2x SSC por 10 minutos. Luego se realiza 3 lavados de 20 minutos cada uno, con solución de lavado 1 (0.2x SSC, SDS 0.1%) a 65°C, seguido de 3 lavados de 20 minutos cada uno, con solución de lavado 2 (0.1x SSC, SDS 0.1%) a 65°C. Por último, la membrana es lavada con solución 0.1x SSC por 5 minutos.

El proceso de revelado incluye la humectación de las membranas con TBS (12mM Tris-Cl pH 7.5, KCl 0.02%, NaCl 0.8%). Enseguida, la membrana es bloqueada al sumergirla en solución de leche descremada al 5% (diluida en TBS) durante 30 minutos. Se debe enjuagar la membrana con TBS, para

luego añadir solución fresca de leche 5% (v/v) incorporando el anticuerpo (*Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments* 0.75 U/ μ l, Roche) a razón de 1:15000, para dejar incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Finalizado este periodo la membrana es lavada brevemente 5 veces con solución TBS. Adicional a esto se lava 2 veces con búfer B (50mM Tris-Cl pH 9.0, 1mM MgCl₂, 0.1M NaCl). En este punto se añade el sustrato o solución de revelado (*BM Purple AP Substrate precipitating*, Roche) hasta observar reacción en los controles positivos en la membrana. Finalmente se realiza un lavado con búfer B para eliminar el sustrato de la membrana y evitar el ruido que se produce por la presencia del sustrato sobre la misma.

2.3 Método de PCR para la detección de IHHNV

2.3.1 Extracción de ácidos nucleicos a partir de tejido

Las muestras almacenadas a -20°C en etanol 95%, fueron procesadas de acuerdo al siguiente protocolo de extracción: se descarta el etanol 95% de la muestra, y se realiza un enjuague con 500 μ l de NaCl 0.85%, luego se descarta el NaCl y se agrega 200 μ l búfer lisis (0.01M NaOH, S.D.S 0.025%) y se macera la muestra. El exoesqueleto es eliminado

al momento de la maceración. Las muestras maceradas son hervidas a 95°C por 10 minutos. Sin dejar enfriar, las muestras son centrifugadas a 13000rpm por 10 minutos. Luego, 150µl de sobrenadante obtenido es depositado en un tubo de 1.7ml con 300µl de etanol 95% helado preparado previamente, y se homogeniza vigorosamente. Esta mezcla se centrifuga a 13000rpm por 5 minutos, generando un *pellet*. Se descarta el etanol 95% evitando tocar el *pellet*, para después agregar 100µl de etanol 70% helado. Esto se centrifuga a 13000rpm por 5 minutos. El etanol 70% es descartado y el tubo conteniendo el *pellet* es dejado sobre papel toalla para que se evapore el etanol residual. Finalmente, el *pellet* es re-suspendido utilizando agua ultra pura entre 30 y 70µl (de acuerdo al tamaño del *pellet*) para luego llevar al vórtex durante 20 minutos. Los tubos son centrifugados 4 segundos a 13000rpm y almacenados a -20°C hasta el momento de su análisis.

2.3.2 Amplificación por PCR

El análisis de las muestras para la detección del IHHNV fue realizado por PCR utilizando los iniciadores 5'-AATTCGACG CTGCCAATGAT-3' y 5'-GCCAATGTTACGTCGGCTTC-3', generando una banda de 345pb. La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: iniciadores (0.5µM de cada uno), dNTPs

(0.2mM), *Taq* (Invitrogen) polimerasa (2.5U/50 μ l), MgCl₂ (1.5mM), en 1x búfer PCR (20mM Tris-HCl, 50mM KCl). Un volumen de 1 μ l de ADN molde fue utilizado por cada 20 μ l de volumen de reacción.

Las mezclas de reactivos fueron desnaturalizadas a 95°C por 3 minutos en un termociclador. Luego se ejecutaron 41 ciclos con los siguientes parámetros: desnaturalización a 95°C por 30 segundos; hibridación a 58°C por 30 segundos; y polimerización a 72°C por 1 minuto. Al finalizar el último ciclo, las muestras fueron polimerizadas a 72°C por 3 minutos y luego almacenadas a 4°C hasta su visualización.

2.3.3 Electroforesis de productos de amplificación

Los productos obtenidos por PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Para la preparación del gel de agarosa, se pesó 1.8g de agarosa ultra pura (Invitrogen) y se diluyó en 150ml de búfer 1x TAE (40mM Tris, 5mM NaOAc, 0.77mM EDTA). Esta preparación fue calentada usando un microondas. La solución homogenizada se dejó enfriar durante 15 minutos y se agregó entre 2 y 5 μ l de bromuro de etidio (0.5^{mg}/ml). Esto fue depositado sobre el soporte de electroforesis hasta que haya solidificado.

El gel fue cargado con 20µl de la muestra usando 1x tampón de carga (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, Sucrosa 25%, Azul de Bromofenol (sal sódica) 0.4^{mg}/ml, Cianol de Xileno 0.4^{mg}/ml). El marcador de peso utilizado fue de preparación casera, evidenciando las bandas de 1040, 702, 505, 345 y 255pb. La electroforesis se realizó a 90 voltios durante 40 minutos. El producto obtenido se visualizó usando una cámara UV.

2.4 Bioensayos y animales experimentales

2.4.1 Ensayo con reproductores de *P. vannamei*

Para este ensayo, fueron seleccionados 50 camarones (*P. vannamei*) de un lote de 120 reproductores con un peso promedio entre 35-40g, provenientes de la maduración BIOGEMAR S.A., situada en Ayangue. Un análisis previo reveló alta prevalencia del IHHNV en estos ejemplares. De los 50 animales seleccionados, el 50% fue determinado positivo para la presencia del virus antes de comenzar el ensayo. Estos camarones fueron colocados por separado en recipientes de 20 litros con agua de mar (34ppt), aireación constante y un flujo de agua de 8 horas durante el día. La alimentación se la realizó 2

veces al día con alimento balanceado comercial con un 35% de proteína.

La muestra tomada era proveniente de uno de los pleópodos del cuarto o quinto segmento del animal y almacenadas en cuatro partes de etanol 95% por cada parte de muestra.

2.4.2 Ensayo con juveniles de *P. vannamei*

En este ensayo se utilizó 200 juveniles de *P. vannamei* con un peso promedio de 1 a 1.6g, provenientes de una línea de reproductores con baja prevalencia del virus, perteneciente al laboratorio BIOGEMAR S.A. (Ayangue).

Estos animales fueron colocados individualmente en recipientes de 250ml de capacidad, con agua de mar (34ppt) previamente tratada (200ppm de hipoclorito de sodio y 140 ppm de tiosulfato de sodio). Una vez por día se realizaba un recambio total de agua. Los camarones fueron muestreados tomando un pleópodo del cuarto o quinto segmento del animal, y almacenadas en 4 partes de etanol 95% por cada parte de muestra.

CAPÍTULO 3

3.RESULTADOS

3.1 Sondas nucleicas para la detección de IHHNV

Uno de los objetivos del presente trabajo fue la generación de sondas nucleicas confiables para la detección de IHHNV. Previo a esto, se definió la región del genoma de IHHNV a ser detectada (ver gráfico #11) utilizando ya sea PCR o el conjunto PCR-*dot blot*.

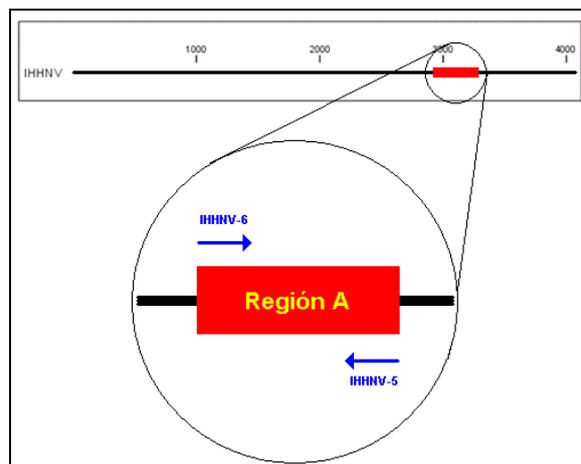


Gráfico # 11. Región A, seleccionada para desarrollar la sonda nucleica. Se muestra también la posición de los iniciadores utilizados para generar la región: IHHNV-5 (5'-AATTGACGCTGCCAATGAT-3') e IHHNV-6 (5'-GCCAATGTTACGTCGGCTTC-3').

Esta región fue escogida como blanco de detección debido a la existencia de protocolos bien establecidos y validados para el diagnóstico de IHHNV en base a la amplificación de dicha región utilizando PCR (BIOGEMAR S.A., datos no publicados). La estrategia general, tanto para la obtención de sondas, como para la generación de fragmentos de ADN control, heterólogos a la sonda, fue la generación de plásmidos conteniendo un segmento específico del genoma viral. Así, el clonaje de los fragmentos de ADN viral para ser utilizados durante la implementación y validación de los protocolos de *dot blot*, permitió contar con un material biológico definido, de secuencia conocida, clonal y fácil de regenerar de forma ilimitada.

3.1.1 Clonaje y secuenciación de un fragmento del genoma de IHHNV como sustrato para la amplificación de sondas específicas

La amplificación del fragmento A, a ser utilizado para el marcaje de sondas con los iniciadores 5'-AATTCGACGCTGCC AATGAT-3' (IHHNV-5) y 5'-GCCAATGTTACGTCGGCTTC-3' (IHHNV-6), produjo el producto esperado de aproximadamente 345pb. El clonaje en la bacteria *E. coli* por medio del vector *pCR[®]4-TOPO[®]* fue exitoso, resultando en múltiples clones recombinantes, de los cuales se caracterizaron dos clones. A partir de estos, se realizaron 3 preparaciones de ADN

plasmídico, dos de ellas provenientes del mismo clon y una tercera a partir de un clon diferente.

Los resultados de la secuenciación de las 3 preparaciones de ADN para la región A, se usaron para generar una secuencia consenso, que luego fue alineada con la secuencia del IHHNV (número de acceso en el *GenBank* AF218266), utilizando la herramienta informática *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov)*. Los resultados de esta alineación mostraron un 98% de identidad entre el consenso y la secuencia referencial del IHHNV (ver gráfico #12), confirmando que el fragmento generado mediante PCR y luego clonado, corresponde a la región seleccionada de IHHNV. La discrepancia en 5 nucleótidos con respecto a la secuencia referencial AF218266 posiblemente obedece a los diferentes orígenes geográficos de ambos aislados, aunque no se descarta la introducción de mutaciones durante el proceso de amplificación por PCR.

```

> gb|AF218266.1|AF218266 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, complete genome
Length=4075

Score = 610 bits (330), Expect = 1e-171
Identities = 341/346 (98%), Gaps = 1/346 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1      GCC-ATGTTACGTCGGCTTCCTTAGTTGATAGTTGATTATGTAGTCCAGTAGTATCCTTA 59
Sbjct 3272   GCCAATGTTACGTCGGCTTCCTTAGTTGATAGTTGATTATGTAGTCCAGTAGTATCCTTA 3213

Query 60     AATATTTCTAAGTATGGGGTCTCTGTAATGTGAGAGTCTCAAATGATGTACCTCCTGAT 119
Sbjct 3212   AATATTTCTAATATGGGGTCTCTGTAATGTGAGAGTCTCAAATGATGTGCCTCCTGAT 3153

Query 120    ACTTTTAAGTCTTTCATAAGGGGTACCATTGAGTGCATCACTACGCCTGCTTTATGTACT 179
Sbjct 3152   ACTTTTAAGTCTTTCATAAGGGGTACCATCGAGTGCATCACTACGCCTGCTTTATGTACT 3093

Query 180    TTCCATCCGTAGGTCCTTCATCAATGATTTTACCATCTTATATCGTTGTGTTTCIGTTGCT 239
Sbjct 3092   TTCCATCCGTAGGTCCTTCATCAATGATTTTACCATCTTATATCGTTGTGTTTCIGTTGCT 3033

Query 240    GAACTGTCGCTGCTCTTTAGACCATAGAGATATAAGTTCATCCAATGTAGTGGGAGGCAG 299
Sbjct 3032   GAACTGTCGCTGCTCTTTAGACCATAGAGATATAAGTTCATCCAATGTAGTGGGAGGCAG 2973

Query 300    TATAAATTTTTTCGTCGAAGTTTCCATCATTGGCAGCGTCGAATT 345
Sbjct 2972   TATAAATTTTTTCGTCGAAGTTTCCATCATTGGCAGCGTCGAATT 2927

```

Gráfico #12. Secuencia de la región A. Alineación del consenso de 3 secuencias provenientes de 2 clones distintos, para la región A (Query) con la secuencia del IHHNV (*Genebank* AF218266, Sbjct), según la herramienta informática *BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.1.2 Clonaje y secuenciación de regiones específicas del genoma de IHHNV para ser usadas como ADN de control

Aparte de la región clonada con el fin de obtener un sustrato para la generación de sondas para *dot blot* (región A), otras regiones del genoma del IHHNV fueron clonadas. Esto se realizó con el fin de obtener fragmentos de ADN viral definidos y distintos a la región que se detectará mediante la sonda nucleica. Estas regiones distintas se usaron como muestras de control al momento de evaluar la especificidad del procedimiento de hibridación usado en el *dot blot*.

El clonaje de las regiones B, C, D, E y F se realizaron sin dificultad; mientras que para la región G no se obtuvo clon alguno. Tal como para la región A, se obtuvieron 3 preparados de ADN (dos de un mismo clon y una de un clon diferente) para las distintas regiones mencionadas. Los resultados de secuenciación fueron analizados de igual forma que para la región A que se detalla en la sección 3.1.1. Todas las secuencias obtenidas mostraron entre un 98 y 99% de identidad con las respectivas regiones del genoma referencial del IHHNV (*Genebank* AF218266).

Los resultados del *BLAST* realizado para cada una de estas regiones clonadas se adjuntan en la sección de anexos.

3.1.3 Evaluación del marcaje de la sonda con digoxigenina

Para corroborar el procedimiento de marcaje de la sonda nucleica con digoxigenina, así como la metodología básica del *dot blot*, se realizó una prueba utilizando dos membranas. Para la primera se utilizó sonda marcada con digoxigenina (producto de PCR sintetizado en presencia de 11-DIG-dUTP), mientras que para la segunda se utilizó un producto de amplificación idéntico pero sin marcar. El blanco a detectar fue el mismo

fragmento de IHNV que se obtiene mediante PCR utilizando los iniciadores que generan la sonda nucleica (región A).

Para la membrana donde se utilizó sonda nucleica marcada, se observaron los puntos o manchas que se generan al obtener una reacción positiva de *dot blot*. Mientras que para la membrana que se utilizó sonda nucleica no marcada, no se obtuvo reacción alguna.

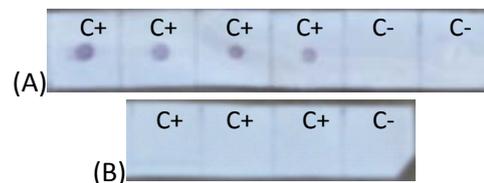


Gráfico #13. Evaluación de la sonda marcada con digoxigenina. (A) se muestra la membrana donde se utilizó sonda nucleica marcada con digoxigenina. (B) Se muestra la membrana en la que se utilizó sonda nucleica sin marcar. En las membranas se utilizaron 4 controles positivos de igual concentración de ADN (réplicas) y un control negativo (agua).

3.1.4 Especificidad de la sonda usada en la reacción de *dot blot* y análisis de la sensibilidad típica de la visualización de los resultados en membrana de nylon y en gel de agarosa.

Con el propósito de demostrar que la sonda que se utiliza en el procedimiento de *dot blot* es de alta especificidad, se expuso ésta a distintos fragmentos de ADN amplificados del genoma del IHNV, previamente secuenciados (A, B, C, D, E, F

y G descritos en la sección 3.1.2.). Al mismo tiempo, se analizó la sensibilidad que se obtiene al visualizar los resultados sobre una membrana de nylon después de hibridarlas con una sonda específica, en relación a lo que puede ser visualizado en un gel de agarosa.

Los resultados demostraron la alta especificidad de la sonda desarrollada, debido a que se comprobó que no hubo reacción positiva con otros fragmentos del virus (B, C, D, E y F). En esta prueba se obtuvo una respuesta positiva, al exponer la sonda nucleica a la región G de 702pb obtenida mediante los iniciadores (5'-TAATGAAGACGAAGAACACGCCGSSGG-3' y 5'-TGGGTAAGTACTAGGTTTCCAAGGGATGGTT-3'). Esto se debe a que el segmento G incluye a la región A, de 345pb, seleccionada como sonda nucleica utilizada para la detección. En otras palabras, la región A (blanco a detectar) forma parte del fragmento G. Ver gráfico #14.

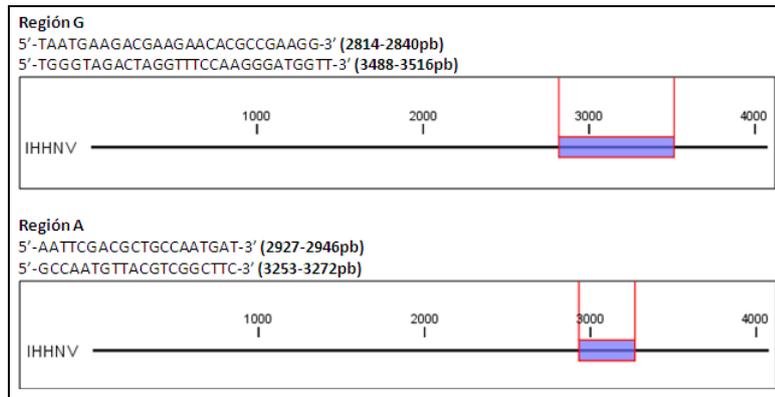


Gráfico #14. Localización de las regiones G y A en el genoma de IHHNV. El sitio que se seleccionó para ser detectado mediante *dot blot*, es la región A.

Al momento de comparar la sensibilidad típica de los dos medios de visualización de resultados, geles de agarosa y *dot blot* en membranas de nylon, se obtuvo una mejor sensibilidad utilizando *dot blot*, pudiendo visualizar productos de una concentración de hasta $3^{pg}/\mu l$ (Gráfico #15); mientras que, al realizar el análisis en los geles de agarosa (1.5%) se llegó a observar hasta una concentración de $2.5^{ng}/\mu l$. Esta dramática diferencia en la sensibilidad de detección de un fragmento de ADN específico por ambos métodos era lo esperado, y es consistente con la idea de que un método de diagnóstico que incorpora el procedimiento de *dot blot* como complemento a la PCR debería incrementar la sensibilidad del diagnóstico basado solamente en visualización de productos de PCR en agarosa.



Gráfico #15. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la sonda. Las diluciones corresponden al fragmento A, complementario a la sonda nucleica, 10^0 corresponde a una concentración de $30^{ng}/\mu l$ de ADN; los controles B, D, E, F y G tienen una concentración de $30^{ng}/\mu l$ sin dilución alguna.

3.2 Optimización del protocolo de *dot blot*

El *dot blot* y otros métodos de detección de ácidos nucleicos basados en hibridación, típicamente requieren de tiempos relativamente largos, desde la toma de muestra hasta la generación de resultados. Con el fin de implementar un protocolo de diagnóstico rápido, se evaluó el potencial de minimizar el tiempo requerido en varias etapas del *dot blot*. El objetivo de estas pruebas fue generar un protocolo de PCR/*dot blot* que permita la obtención de resultados en un día o menos.

3.2.1 Evaluación del tiempo y tipo de secado de las membranas de nylon

El tiempo y el tipo de secado de una membrana, después de ser cargada con el ADN a analizar, fue uno de los puntos que se consideraron para la optimización del protocolo. Para

esto, se utilizaron diversas membranas, cargadas con varias diluciones de ADN del fragmento a detectar. Las membranas fueron secadas, ya sea al ambiente o en un horno a 65°C, considerando tiempos variados para los dos tipos de secado.

Las membranas mostraron los mismos resultados en cuanto a eficacia al momento de detectar una cierta cantidad de ADN objetivo. Como se observa en la figura #16, las membranas (a) y (b), que fueron secadas a temperatura ambiente durante 1 y 2 horas respectivamente, no se diferenciaron de las membranas (c), 1 hora; (d), 2 horas; y (e), 15 minutos; secadas en un horno a 65°C. Los controles negativos no mostraron reacción alguna, indicando que la prueba se desarrolló de forma adecuada.

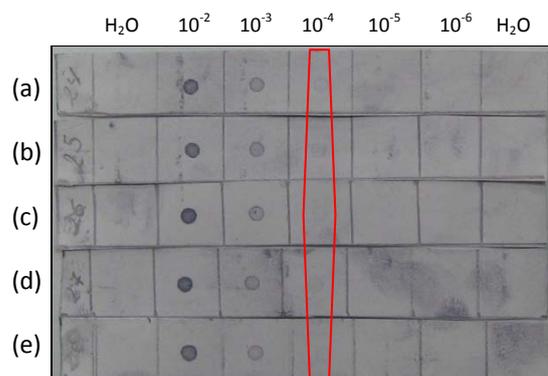


Gráfico #16. Determinación del tiempo y tipo de secado de las membranas. Dentro del marco se puede observar la última dilución capaz de ser detectada por la técnica, la cual fue la misma en todas las variaciones ensayadas en esta prueba.

Basándose en los resultados obtenidos, se eligió un tiempo de secado de 15 minutos a 65°C (por ser el más rápido). Sin embargo, debido a que el secado al ambiente no afecta la sensibilidad del ensayo, es posible utilizar esta opción cuando las condiciones experimentales o logísticas lo requieran.

3.2.2 Disminución del tiempo de diagnóstico

La realización de algunas pruebas, en especial acerca del tiempo de hibridación, fue de utilidad para llegar a optimizar el protocolo de *dot blot* en lo que se refiere al tiempo necesario para practicar esta técnica. Estas pruebas permitieron establecer un protocolo de diagnóstico mediante el sistema conjunto de PCR/*dot blot* factible de ser ejecutado en un solo día.

En uno de estos ensayos se utilizaron tres membranas conteniendo las mismas muestras en cada una de ellas. Cada una de las tres membranas (a), (b) y (c) fueron expuestas a distintos tiempos de hibridación. Las membranas (b), con 2 horas de hibridación; y (c) con 4 horas de hibridación, mostraron la misma capacidad de detección. Mientras que en la membrana (a), hibridada durante 1 hora, se observó una pequeña reducción en la intensidad de revelado, en especial en

las concentraciones cercanas al límite de detección ($3^{pg}/\mu l$) (ver gráfico #17).



Gráfico #17. Evaluación del tiempo de hibridación. Las diluciones corresponden al fragmento A, complementario a la sonda nucleica, 10^0 corresponde a una concentración de $30^{ng}/\mu l$ de ADN. Los tiempos de hibridación utilizados para cada membrana fueron (a) 1 horas, (b) 2 horas, y (c) 4 horas.

3.2.2.1 Protocolo optimizado de *dot blot*

En base a las pruebas anteriormente descritas, que permitieron establecer los parámetros óptimos de *dot blot* para una detección rápida sin disminución de la sensibilidad, se estableció el siguiente protocolo optimizado.

3.2.2.1.1 Pre-hibridación

La membrana es humedecida en solución 2x SSC (0.75M NaCl; 75mM Citrato de Sodio). Enseguida es sumergida en solución 1 (0.5M NaCl; 0.2N NaOH) durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se sumerge en solución 2 (1M NaCl; 0.5M Tris-Cl pH 8.0) durante 10 minutos. En este momento, la membrana es colocada en una funda plástica con cierre hermético, agregando solución de hibridación con una incubación a 65°C 30 minutos.

3.2.2.1.2 Hibridación

La sonda nucleica es llevada a 95°C durante 3 minutos, para la desnaturalización de la doble cadena. Se descarta la solución de hibridación y se coloca nueva solución de hibridación previamente llevada a 65°C. En este momento, se adiciona a la membrana la sonda inmediatamente después de haberla calentado. La membrana se deja hibridar durante 2 horas a 65°C.

3.2.2.1.3 Post-hibridación

La membrana es transferida de la funda plástica a un recipiente, donde se sumerge en solución 2x SSC por 5 minutos. Luego se realiza 6 lavados de 5 minutos cada uno, con solución de lavado 1 (0.2x SSC, SDS 0.1%) a 65°C. Después, se realiza 6 lavados de 5 minutos cada uno, con solución de lavado 2 (0.1x SSC, SDS 0.1%) a 65°C. Por último, la membrana es lavada con solución 0.1x SSC por 5 minutos.

El proceso de revelado incluye la humectación de las membranas con TBS (12mM Tris-Cl pH 7.5; KCl 0.02%; NaCl 0.8%). Enseguida, la membrana es sumergida durante 15 minutos en solución de leche descremada 5% (diluida en TBS). Se debe enjuagar la membrana con TBS, para luego añadir nueva solución de leche 5% incorporando el anticuerpo (*Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments*, Roche) a razón de 1:15000 e incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos.

Finalizado este periodo la membrana es lavada 5 veces con solución TBS. Adicional a esto se lava 2 veces con búfer B (50mM Tris-Cl pH 9.0; 1mM MgCl₂; 0.1M NaCl). En este punto se añade la solución reveladora o sustrato (*BM Purple AP Substrate precipitating*, Roche) hasta observar reacción en los controles positivos de la membrana. Finalmente se da un lavado con búfer B para eliminar el sustrato de la membrana y evitar el ruido que se produce por la presencia del sustrato sobre la misma.

3.3 Comparación de algunos parámetros entre la PCR y el conjunto PCR/*dot blot*

3.3.1 Análisis de la sensibilidad de la PCR y del conjunto PCR/*dot blot*

Esta prueba se realizó con el fin de conocer la cantidad mínima de material genético que las técnicas (PCR y PCR/*dot blot*) requieren para poder emitir un diagnóstico; considerando la hipótesis de que con una cantidad muy pequeña de ADN, la PCR no produce respuesta de diagnóstico, mientras que, el conjunto PCR/*dot blot* logra expresar respuesta con un rango menor de ADN inicial, en otras palabras el

conjunto PCR/*dot blot* tiene mayor sensibilidad al momento de realizar diagnósticos. Para esto se procedió a detectar, ya sea por PCR o por PCR/*dot blot*, la presencia del fragmento de ADN blanco en diluciones seriales del producto previamente purificado y cuantificado.

Analizando los resultados se observó que, la PCR por sí sola necesitó un mínimo de $2 \times 10^{-10} \text{ ng}/\mu\text{l} \approx 2^a/\mu\text{l}$ de ADN para obtener una respuesta de diagnóstico (ver Gráfico #18).



Gráfico #18. Sensibilidad de la PCR para la detección de IHHNV. Gel de agarosa donde se han migrado las reacciones de PCR usadas para detectar un fragmento de IHHNV diluido serialmente. La cantidad de ADN sustrato usado en cada reacción de amplificación fue ($\text{ng}/\mu\text{l}$): 1 (2×10^{-7}), 2 (2×10^{-8}), 3 (2×10^{-9}), 4 (2×10^{-10}), 5 (2×10^{-11}), 6 (2×10^{-12}), 7 (2×10^{-13}), 8 (2×10^{-14}), 9 (2×10^{-15}), 10 (2×10^{-16}). Se notan ciertos productos inespecíficos (de distinto tamaño al esperado) en dos de los controles negativos.

La cantidad mínima de ADN blanco que el conjunto de PCR/*dot blot* logró detectar fue de $2 \times 10^{-13} \text{ ng}/\mu\text{l} \approx 0.002^a/\mu\text{l}$ (ver Gráfico #19). Este resultado demuestra que es posible incrementar la sensibilidad del diagnóstico por PCR aplicando *dot blot* para la subsecuente detección del producto de amplificación.

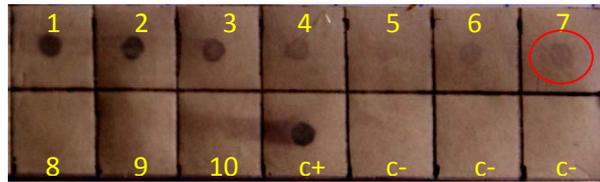


Gráfico #19. Sensibilidad del conjunto PCR/*dot blot*. Membrana donde se muestran los resultados obtenidos en una prueba de *dot blot* aplicada a los productos de amplificación mostrados en la Gráfico # 18. Las muestras son las mismas detalladas en la Gráfico #18.

3.4 Aplicación del *dot blot* en los ensayos experimentales para complementar el diagnóstico por PCR

3.4.1 Análisis de reproductores de *P. vannamei*

El análisis constó con un número final de 169 muestras de ADN recolectadas de 50 reproductores de *P. vannamei*. Los animales fueron muestreados en cuatro ocasiones en intervalos de 5 días, para obtener un número considerable de muestras con poca cantidad de animales. La mortalidad durante el transcurso del experimento impidió obtener las 200 muestras que se esperaban. Según los resultados generados, se obtuvo un porcentaje del 79.9% de presencia viral del total de muestras según PCR/*dot blot*, mientras que el análisis basado en PCR simple, determinó un 69.83% de positivos para las muestras analizadas. Esto indica que el uso del *dot blot* permitió detectar IHHNV en un 10.07% de muestras adicionales a lo determinado por PCR simple. Así se demuestra que ciertas muestras calificadas como

negativas por ausencia de productos de amplificación visibles en agarosa, contienen ADN viral amplificado, el cual puede ser detectado mediante la técnica de *dot blot*, resultando en un incremento en la sensibilidad del diagnóstico.

De las 50 muestras declaradas como negativas para el virus según la técnica de PCR, 16 muestras (32%) respondieron positivamente al análisis del sistema conjunto PCR/*dot blot* para el mismo virus. Este resultado advierte las ventajas de completar el diagnóstico basado en PCR con métodos moleculares alternativos, tales como *dot blot*.

Una de las contribuciones más importantes del *dot blot* como complemento a la PCR en estos estudios fue la clarificación de muestras cuyo estatus (positivo o negativo) era de difícil interpretación en base a la visualización de productos de amplificación en agarosa.

El gráfico #20 muestra un ejemplo de este fenómeno: en varias muestras se observan numerosos productos inespecíficos provenientes de la amplificación de ADN durante la PCR (el producto específico generado por los iniciadores es de 345pb). En varias instancias, resulta imposible determinar con confiabilidad si el producto de amplificación específico está presente, debido a la presencia de múltiples productos distintos al objetivo, que incluso pueden coincidir

en tamaño aparente con el producto esperado. En estas instancias, la subsecuente hibridación en *dot blot* demuestra que en efecto algunas de estas muestras con estatus dudoso contienen el producto de amplificación correspondiente al ADN viral, mientras que otras son negativas.

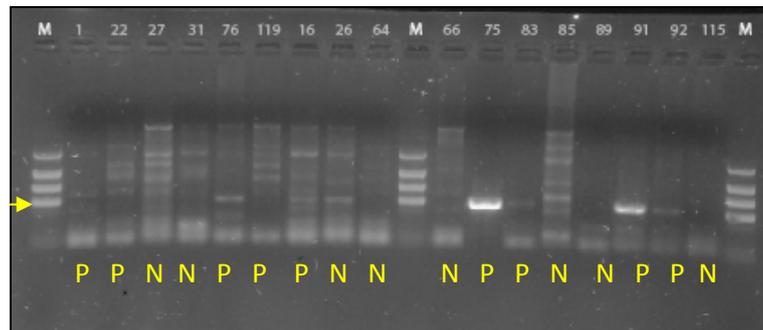


Gráfico #20. Clarificación de resultados erróneos de PCR usando el conjunto PCR/*dot blot*. Las letras amarillas son los resultados obtenidos mediante la aplicación del *dot blot* al producto de amplificación de PCR (sistema conjunto PCR/*dot blot*). P: positivo, N: negativo. La flecha indica el tamaño de 345pb (objetivo).

3.4.2 Análisis de juveniles de *P. vannamei*

En este ensayo, un total de 480 muestras fueron analizadas mediante el sistema de PCR simple y el conjunto PCR/*dot blot*. Basado en los resultados obtenidos mediante el conjunto PCR/*dot blot*, se determinó un valor del 13.3% (64 muestras) de positivos para el virus del IHHNV; mientras que el análisis realizado por PCR simple detectó un 7.48% (36 muestras) de positivos para el virus.

Durante el análisis de las muestras de juveniles se observó, inesperadamente, un número pequeño del total de muestras (4%) aparentemente positivas para el IHHNV en base a PCR simple, pero negativas mediante PCR/*dot blot*. Este resultado es inesperado porque el conjunto PCR/*dot blot* tiene una sensibilidad superior a la PCR (ver gráficos #18 y 19), y por tanto se espera que toda muestra positiva en base a PCR sea también positiva al someterla a la reacción de PCR/*dot blot*. Existen varias posibles explicaciones para este resultado: puede ser que el producto de amplificación observado en el análisis de PCR en estas muestras coincida en talla con el producto específico, pero sin embargo corresponda a un producto de amplificación inespecífico. En su defecto, es posible que errores técnicos en la ejecución del *dot blot* hayan impedido la detección de algunas muestras legítimamente positivas.

CAPÍTULO 4

4.DISCUSIÓN

La camaronicultura a nivel mundial ha tenido un crecimiento notorio desde sus inicios, sin embargo la arremetida de enfermedades, en especial las causadas por agentes virales, ha ocasionado declives productivos de la actividad; originando que los productores de camarón implementen herramientas más adecuadas, como las técnicas moleculares, para la detección de estos patógenos.

Una de las técnicas moleculares que se utiliza para generar diagnósticos es la PCR; pero ésta, al igual que otras técnicas, tiene sus limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad, lo que puede ocasionar un diagnóstico de poca confiabilidad en algunos casos. Otras técnicas usadas son aquellas basadas en sondas nucleicas; las cuales, en comparación con la PCR, poseen típicamente menor sensibilidad, pero un mayor grado de especificidad.

La estrategia que se planteó al inicio de este trabajo para desarrollar un protocolo de diagnóstico para IHHNV fue tomar ventaja de las bondades

de la PCR y del *dot blot* (este último fue escogido por ser un método sencillo dentro del grupo de técnicas basadas en sondas nucleicas).

Se logró demostrar que la integración de estas dos técnicas (PCR y *dot blot*) proporciona mejores resultados de diagnóstico de lo que estas dos técnicas podrían mostrar por sí solas. Así, la PCR utilizada tuvo un límite de detección de $2^{ag}/\mu l$, mostrando en algunos casos resultados ambiguos. Por otro lado, el *dot blot* por sí solo mostró un límite de detección de tan solo $3^{pg}/\mu l$, pero no se evidenciaron falsos positivos ni resultados ambiguos durante las pruebas de evaluación. La sensibilidad del *dot blot* desarrollado es comparable a lo obtenido por Bedoya en 1996, quien demostró una sensibilidad de hasta $10^{pg}/\mu l$; al desarrollar sondas nucleicas marcadas con digoxigenina para *Vibrio alginolyticus*. La integración de PCR y *dot blot* en un método de diagnóstico conjunto permitió la detección de hasta $0.002^{ag}/\mu l$, y la resolución de un número importante de resultados ambiguos en pruebas de validación con muestras de *P. vannamei*.

Vale recalcar que los límites de detección aquí reportados corresponden a estimados basados en un ADN generado artificialmente, y cuya concentración fue estimada mediante espectrofotometría. Ciertos factores, tales como la complejidad y pureza de muestras de ácido nucleico preparadas a partir de tejido, probablemente afectan la capacidad de detección del conjunto PCR/*dot blot*. Es así que la sensibilidad de estos

protocolos en muestras de *P. vannamei* es probablemente menor a la determinada usando un fragmento de ADN viral purificado.

El conjunto PCR/*dot blot* desarrollado en este trabajo podría ser utilizado para la selección de reproductores necesarios para la producción de larvas de camarón en laboratorios, debido al alto grado de confiabilidad que esta técnica proporciona. Así, se obtendría un lote de larvas con baja prevalencia para un cierto patógeno, en este caso, para IHHNV; reflejando un posible incremento en la producción de este crustáceo, aludiendo la prevalencia baja de una enfermedad que causa deformidades y enanismo, como lo es el RDS.

CONCLUSIONES

- 1) Se implementó un protocolo de *dot blot* usando sondas nucleicas preparadas a partir de ADN clonal para la detección de IHHNV.
- 2) El uso conjunto de PCR y *dot blot* en un protocolo optimizado de detección de IHHNV permite ejecutar el diagnóstico de este virus en menos de 24 horas, con un límite de detección estimado de hasta $0.002^{ag}/\mu l$ de ADN viral.
- 3) La adición de un componente de *dot blot* al protocolo de detección de IHHNV en base a PCR incrementa la especificidad del diagnóstico, facilitando la calificación de un número significativo de muestras, cuyo diagnóstico en base a PCR es ambiguo.

RECOMENDACIONES

- 1) Estudios más extensos de validación de los beneficios del uso del conjunto PCR/*dot blot*, en comparación con otras técnicas de diagnóstico, serán necesarios para documentar más rigurosamente las posibles ventajas de esta estrategia en situaciones reales de diagnóstico.
- 2) En base a los lineamientos técnicos discutidos en el presente trabajo, debería ser factible la aplicación de protocolos conjuntos de PCR/*dot blot* para la detección de otros agentes virales de importancia en la camaronicultura.

Anexos

Anexo A

```
> gb|AF218266.1|AF218266 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, complete genome
Length=4075

Score = 833 bits (451), Expect = 0.0
Identities = 461/466 (98%), Gaps = 0/466 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 AAGTGACGGCGGACAAATATCCCTGACTCTAAATGACTGACTGACGACAGGGATTTTAGTC 60
      |||
Sbjct 3999 AAGTGACGGCGGACAAATATCCCTGACTCTAAATGACTGACTGACGATAGGGATTTTAGTC 3940

Query 61 TTTTGTAAAGTGACGTAAGTGACGAAATATGTCGTCAATAGAAAGAAAAGTGTCACCACCATG 120
      |||
Sbjct 3939 TTTTGTAAAGTGACGTAAGTGACGAAATATGTCGTCAATAGAAAGAAAAGTGTCACCACCATG 3880

Query 121 CCTGGGTAGCCGGAGTCCCACCTTGCCITGGGTAGCTGGTATGTATATAGGGTAGGTATAG 180
      |||
Sbjct 3879 CCTGGGTAGCCGGAGTCCCACCTTGCCITGGGTAGCTGGTATGTATATAGGGTAGGTATAG 3820

Query 181 ATGATAATAAGCTATACATGTTTATTGGTAAAAGCTGGATATAATCGGGTGTATATTGCA 240
      |||
Sbjct 3819 ATGATAATAAGCTATATATGTTTATTGGTAAAAGCTGGATATAATCGGGTATATATTGCA 3760

Query 241 CATCGAATATATTTAGTTAGTATGCATAATATAACATTTGTTAAGTTGCCAGTACATGG 300
      |||
Sbjct 3759 CATCGAATATATTTAGTTAGTATGCATAATATAACATTTGTTAAGTTGCCAGTACATGG 3700

Query 301 TCGGTGAAGATATTGTAACATCCCCAAACTTGGCGTACATCCTTGTGGTGGGAGTCGTAC 360
      |||
Sbjct 3699 TCGGTGAAGATATTGTAACATCCCCAAACTTGGGACACATCCTTGTGGTGGGAGTCGTAC 3640
```

Alineación del consenso de 3 secuencias provenientes de 2 clones distintos, para la región B (Query) con la secuencia del IHHNV (*Genebank* AF218266, Sbjct), según la herramienta informática *BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Anexo B

```
> gb|AF218266.1|AF218266 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, complete genome
Length=4075

Score = 649 bits (351), Expect = 0.0
Identities = 359/363 (98%), Gaps = 0/363 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 AAGTGACGGCGGACAAATATCCCTGACTCTAAATGACTGACTGACGACAGGGATTTAGTC 60
      |||
Sbjct 3999 AAGTGACGGCGGACAAATATCCCTGACTCTAAATGACTGACTGACGATAGGGATTTAGTC 3940

Query 61 TTTTGTAAAGTGACGTAAGTGACGAAATATGTCGTCAATAGAGAAAAGTGCCACCATG 120
      |||
Sbjct 3939 TTTTGTAAAGTGACGTAAGTGACGAAATATGTCGTCAATAGAGAAAAGTGCCACCATG 3880

Query 121 CCTGGGTAGCCGGAGTCCCACCTTGCCTGGGTAGCTGGTATGTATATAGGGTAGGTATAG 180
      |||
Sbjct 3879 CCTGGGTAGCCGGAGTCCCACCTTGCCTGGGTAGCTGGTATGTATATAGGGTAGGTATAG 3820

Query 181 ATGATAATAAGCTATACATGTTTATGGTAAAAGCTGGATATAATCGGGTATATATTGCA 240
      |||
Sbjct 3819 ATGATAATAAGCTATATATGTTTATGGTAAAAGCTGGATATAATCGGGTATATATTGCA 3760

Query 241 CATCGAATATATTTAGTTAGTATGCATAATATAACATTTGTTAAGTTGCCAGTACATGG 300
      |||
Sbjct 3759 CATCGAATATATTTAGTTAGTATGCATAATATAACATTTGTTAAGTTGCCAGTACATGG 3700

Query 301 TCGGTGAAGATATTGTAACATCCCCTGCGGACATCCTTGTGGTGGGAGTCGTAC 360
      |||
Sbjct 3699 TCGGTGAAGATATTGTAACATCCCCTGCGGACATCCTTGTGGTGGGAGTCGTAC 3640
```

Alineación del consenso de 3 secuencias provenientes de 2 clones distintos, para la región C (Query) con la secuencia del IHHNV (Genbank AF218266, Sbjct), según la herramienta informática BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Anexo C

```
> gb|AF218266.1|AF218266 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, complete genome
Length=4075

Score = 582 bits (315), Expect = 2e-163
Identities = 321/324 (99%), Gaps = 0/324 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 CTGACGATAGGGATTTTAGTCITTTTGTAAAGTGACGAAATATGTCGTCGAATA 60
      |||
Sbjct 3960 CTGACGATAGGGATTTTAGTCITTTTGTAAAGTGACGAAATATGTCGTCGAATA 3901

Query 61 GAAGAAAAGTGTCCCACCATGCCTGGGTAGCCGGAGTCCCACCTTGCCCTGGGTAGCTGGT 120
      |||
Sbjct 3900 GAAGAAAAGTGTCCCACCATGCCTGGGTAGCCGGAGTCCCACCTTGCCCTGGGTAGCTGGT 3841

Query 121 ATGTATATAGGGTAGGTATAGATGATAAATAAGCTATACATGTTTATTGGTAAAAGCTGGA 180
      |||
Sbjct 3840 ATGTATATAGGGTAGGTATAGATGATAAATAAGCTATACATGTTTATTGGTAAAAGCTGGA 3781

Query 181 TATAATCGGGTATATATTGCACATCGAATATATTTAGTTAGTATGCATAATATAACATT 240
      |||
Sbjct 3780 TATAATCGGGTATATATTGCACATCGAATATATTTAGTTAGTATGCATAATATAACATT 3721

Query 241 GTTAAAGTGTCCAGTACATGGTGCSTGAAGATATTGTAACATCCCCAAACTTGGCGGTACA 300
      |||
Sbjct 3720 GTTAAAGTGTCCAGTACATGGTGCSTGAAGATATTGTAACATCCCCAAACTTGGCGGTACA 3661

Query 301 TCCTTGTGGTGGGAGTCGTACTTC 324
      |||
Sbjct 3660 TCCTTGTGGTGGGAGTCGTACTTC 3637
```

Alineación del consenso de 3 secuencias provenientes de 2 clones distintos, para la región D (Query) con la secuencia del IHHNV (*Genebank* AF218266, Sbjct), según la herramienta informática *BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Anexo D

```

> gb|AF218266.1|AF218266 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, complete
genome
Length=4075

Score = 1166 bits (631), Expect = 0.0
Identities = 635/637 (99%), Gaps = 0/637 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GGAAGTGTGGAAACAGTAATGACAGGGGTAAAAAGAGACAGAGAGGAATTACTTACATC 60
            |||
Sbjct 1152   GGAAGTGTGGAAACAGTAATGACAGGGGTAAAAAGAGACAGAGAGGAATTACTTACATC 1211

Query 61     AGTGACACATCAGATTCCCTCCGGATCAGATGACGAAAATCTGGGTACACCACATCGAAT 120
            |||
Sbjct 1212   AGTGACACATCAGATTCCCTCCGGATCAGATGACGAAAATCTGGGTACACCACATCGAAT 1271

Query 121    AAAAGAACCAGAACTCCAACACCACAAAAGAGACAGGCGGAGGAGACACCAGCAGAT 180
            |||
Sbjct 1272   AAAAGAACCAGAACTCCAACACCACAAAAGAGACAGGCGGAGGAGACACCAGCAGAT 1331

Query 181    CAGGAAAGCGATCATGGAAGCAATGAAAATCGACTGGAACCTACCGATGGAGGAGAGGC 240
            |||
Sbjct 1332   CAGGAAAGCGATCATGGAAGCAATGAAAATCGACTGGAACCTACCGATGGAGGAGAGGC 1391

Query 241    TGTAGTAGCGGAACACAACCCGACTTTATTGAAGGGACTCCCAACGGACCCGACGAATG 300
            |||
Sbjct 1392   TGTAGTAGCGGAACACAACCCGACTTTATTGAAGGGACTCCCAACGGACCCGACGAATG 1451

Query 301    GACGGAAGGCGACTGGAAGAGAGTGAGATTGATAAACAAAGTGGAAAGTACAACATGGTAC 360
            |||
Sbjct 1452   GACGGAAGGCGACTGGAAGAGAGTGAGATTGATAAACAAAGTGGAAAGTACAACATGGTAC 1511

Query 361    ACCTTCGTCATCAGAGAAAAACCACAACCAAGAAGACTCTCCGGAAGAACGCCAACTTC 420
            |||
Sbjct 1512   ACCTTCGTCATCAGAGAAAAACCACAACCAAGAAGACTCTCCGGAAGAACGCCAACTTC 1571

Query 421    ACCATTACAGATCATGGTGACCACTGGCACAATCATACTCCGGACACCCCAACCAATAAG 480
            |||
Sbjct 1572   ACCATTACAGATCATGGTGACCACTGGCACAATCATACTCCGGACACCCCAACCAATAAG 1631

Query 481    ACCAGACATAGAGCTACAATCCTCGCCTATTGGGAGTTACCTTTGCTGCCAGAGCCGAA 540
            |||
Sbjct 1632   ACCAGACATAGAGCTACAATCCTCGCCTATTGGGAGTTACCTTTGCTGCCAGAGCCGAA 1691

```

Alineación del consenso de 3 secuencias provenientes de 2 clones distintos, para la región E (Query) con la secuencia del IHHNV (*Genebank* AF218266, Sbjct), según la herramienta informática *BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Anexo E

```
> gb|AF218266.1|AF218266 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, complete genome
Length=4075

Score = 979 bits (530), Expect = 0.0
Identities = 534/536 (99%), Gaps = 0/536 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GGAAGTGTGGAAACAGTAATGACAGGGGTAAAAAGAGACAGAGAGGAATTACTTACATC 60
            |||
Sbjct 1152    GGAAGTGTGGAAACAGTAATGACAGGGGTAAAAAGAGACAGAGAGGAATTACTTACATC 1211

Query 61     AGTGACACATCAGATTCCCTCCGGATCAGATGACGAAAATCTGGGTACACCACATCGAAAT 120
            |||
Sbjct 1212    AGTGACACATCAGATTCCCTCCGGATCAGATGACGAAAATCTGGGTACACCACATCGAAAT 1271

Query 121    AAAAGAACCAGAACTCCAACACCACAAAAGAGACAGGCGGAGGAGACACCACGAGAT 180
            |||
Sbjct 1272    AAAAGAACCAGAACTCCAACACCACAAAAGAGACAGGCGGAGGAGACACCACGAGAT 1331

Query 181    CAGGAAAGCGATCATGGAAGCAATGGAATCGACTGGAACCTACCGATGGAGGAGAGAGC 240
            |||
Sbjct 1332    CAGGAAAGCGATCATGGAAGCAATGGAATCGACTGGAACCTACCGATGGAGGAGAGAGC 1391

Query 241    TGTAGTAGCGGAACACAAACCGACTTTATTGAAGGGACTCCCAACGGACCGGACGAAATG 300
            |||
Sbjct 1392    TGTAGTAGCGGAACACAAACCGACTTTATTGAAGGGACTCCCAACGGACCGGACGAAATG 1451

Query 301    GACGGAAGGCGACTGGAAGAGAGTGAGATTGATAAACAAGTGGAAAGTACAACATGGTAC 360
            |||
Sbjct 1452    GACGGAAGGCGACTGGAAGAGAGTGAGATTGATAAACAAGTGGAAAGTACAACATGGTAC 1511

Query 361    ACCTTCGTCATCAGAGAAAACCACAACCAAGAGACTCTCCGGAGAACGCCAAACTTC 420
            |||
Sbjct 1512    ACCTTCGTCATCAGAGAAAACCACAACCAAGAGACTCTCCGGAGAACGCCAAACTTC 1571

Query 421    ACCATTACAGATCATGGTGACCACTGGCACATCACATACTCCGGACACCCAAACCAATAAG 480
            |||
Sbjct 1572    ACCATTACAGATCATGGTGACCACTGGCACATCACATACTCCGGACACCCAAACCAATAAG 1631

Query 481    ACCAGACATAGAGCTACAATCCTCGCCTATTGGGAGTTACCTTTGCTGCCAGAGC 536
            |||
Sbjct 1632    ACCAGACATAGAGCTACAATCCTCGCCTATTGGGAGTTACCTTTGCTGCCAGAGC 1687
```

Alineación del consenso de 3 secuencias provenientes de 2 clones distintos, para la región F (Query) con la secuencia del IHHNV (*Genebank* AF218266, Sbjct), según la herramienta informática *BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Libro Blanco del Camarón (1993) Cámara de Productores de Camarón. II Edición 1-3.
- (2) Lightner, D. (1996b) A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA.
- (3) Bonami, J-R., Hasson, K., Mari, J., Poulos, B. and Lightner, D. (1997) Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *Journal of General Virology*, **78**: 313-319.
- (4) Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakamo, H., Kimura, T., Momoyama, K., Hiraoka, M. (1994) Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Peneaus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol*, **29**: 149-158.
- (5) Global Aquaculture Alliance (GAA) (1999a) Shrimp white spot virus confirmed in Central America. GAA Newsletter 2 (2).

- (6) Global Aquaculture Alliance (GAA) (1999b) Shrimp white spot disease in Latin America –an update. GAA Newsletter 2 (3).
- (7) Pillay (1997). Acuicultura Principios y Prácticas. *Limusa Noriega Editores*. I Edición. Pp. 523.
- (8) Chen, Lo-Chai (1990). Aquaculture in Taiwan. *Fishing News Books*. Pp. 150-152.
- (9) Fishstat-FAO, www.fao.org
- (10) Instituto de Estrategias Agropecuarias (IDEA) (1989) Situación Actual de la Maricultura del Camarón en el Ecuador y Estrategias Para su Desarrollo Sostenido. Memorias del Seminario y Documento Técnico. Pp. 114, 121 y 123.
- (11) Calderón, J. & Sonnenholzner, S. (1993) En memoria de Edgar Arellano M. once años dedicados a la investigación y desarrollo de la Acuicultura en el Ecuador. *FIMCM-ESPOL*. Pp.10-23.
- (12) Melena, J., Bayot, B., Betacourt, I., Amano, Y., Panchana, F., Alday, V., Calderón, J., Stern, S., Roch, Ph. and Bonami, J-R. (2006) Pre-exposure to infectious hypodermal and hematopietic necrosis virus or to inactivated white spot syndrome virus (WSSV) confers protections against WSSV in *Penaeus vannamei* (Boone) post-larvae. *Journal of*

Fish Diseases, **29**: 589-600.

- (13) Acuacultura (2008) Cámara Nacional de Acuacultura. Edición 70. Pp. 64-66.
- (14) Vaseeharan, B., Jayakumar, R. and Ramasamy, P. (2003) PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. *Letters in Applied Microbiology*, **37**: 443-447.
- (15) Lundin, G. (1996) Fish health quarantine. In The World Bank Report. Global Attempts to Address Shrimp Disease. Marine/Environmental paper No. 4. Rome: Land, water and natural habitats Division, Environment Department.
- (16) Bonnichon, V., Lightner, D., Bonami, J. (2006) Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **72**: 179-184.
- (17) Lightner, D., Hasson, K., White, B. and Redman, R. (1998) Experimental of white spot syndrome of Western Hemisphere penaeid shrimp whit Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *Journal of Aquatic Animal Health*, **10**: 271-281.
- (18) Flegel, T. (1997) Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of*

Microbiology and Biotechnology, **13**: 433-442.

- (19) Flegel, T. and Alday-Sanz, V. (1998) The crisis in Asian shrimp aquaculture, current status and future needs. *Journal of Applied Ichthyology*, **14**: 269-273.
- (20) Lightner, D. (2003) Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. In: Lee CS, O'Bryen PJ (eds) Biosecurity in aquaculture production systems: exclusion of pathogens and other undesirables. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, Pp. 81-116.
- (21) Lightner, D., Pantoja, C., Poulos, B., Tang, K., Redman, R., Andreas, T., & Bonami, J-R. (2004) Infectious Myonecrosis (IMN): a New Virus Disease of *Litopenaeus vannamei*. Book of Abstracts. *World Aquaculture 2004*, March 2-5, 2004, Honolulu, HI. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, USA.
- (22) Tang, K., Pantoja, C., Poulos, B., Redman, R., Lightner, D. (2005) *In situ* hybridization demonstrates that *Penaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis Aquat Org*, **63**:261–265.
- (23) Tang, K., Pantoja, C., Redman, R. and Lightner, D. (2007) Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the

detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **75**: 183-190.

- (24) Momoyama, K., Hiraoka, M., Nakamo, H., Koube, H., Inouye, K., Oseko, N. (1994) Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: histopathological study. *Fish Pathol*, **29**: 141-148.
- (25) Nakamo, H., Koube, H., Umezawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., Oseko, S. (1994) Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: epizootiological survey and infectious trials. *Fish Pathol*, **29**: 135-139.
- (26) Hossain, M., Ota, S., Chakraborty, A., Kumar, H., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2004) Detection of WSSV in cultured shrimps, captured brooders, shrimp postlarvae and water samples in Bangladesh by PCR using different primers. *Aquaculture*, **237**: 59-71.
- (27) FAO (1999) Diagnosis of shrimp diseases: whit emphasis on the black tiger shrimp.
- (28) Wang, C., Lo, C., Leu, J., Chou, C., Yeh, P., Chou, H., Tung, M., Chang, C., Su, M., Kou, G. (1995) Purification and genomic analysis of baculovirus associated whit white spot syndrome (WSBS) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org*, **23**: 239-242.

- (29) van Hulten, M., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, M., Sandbrink, H., Klein, R., Vlak, J. (2001a) The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, **286**: 7-22.
- (30) Vlak, J., Bonami, J., Flegel, T., Kou, G., Lightner, D., Loh, C., Loh, P., Walker, P. (2004) *Nimaviridae*. In: Fauquet, C., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. (eds) VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, London, Pp. 187-192.
- (31) Boonyaraptalin, S., Supamattaya, K., Kasornchandra, J., Direkbusaracom, S., Aekpanithanpong, U., Chantanachooklin, C. (1993) Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*, **28**: 103-109.
- (32) Mohan, C., Shankar, K., Kulkarni, S. and Sudha, P. (1998) Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Diseases of Aquatic Organisms*, **34**: 9-12.
- (33) Rodríguez, M., Linné, M., Rodríguez, G., Monroy, Y., Mata, J. (2001) Manual de enfermedades de camarones Peneidos en México. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, Vol. 2.

- (34) Withyachumnarnkul, B., Boonsaeng, V., Flegel, T., Panyim, S., Wongteerasupaya, C. (1998) Domestication and selective breeding of *Penaeus monodon* in Thailand. In: Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. Proceedings of the Special Session on Shrimp Biotechnology. *National Center for Genetic Engineering and Biotechnology*, Bangkok, Pp 73–80.
- (35) Withyachumnarnkul, B., Plodphai, P., Nash, G., Fegan, D. (2001) Growth rate and reproductive performance of F4 domesticated *Penaeus monodon* broodstock. In: Proceedings of the 3rd National Symposium of Marine Shrimp. *National Center for Genetic Engineering and Biotechnology*, Bangkok, Pp. 33-40.
- (36) Chantanachookin, C., Boonyaraptalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusaracom, S., Ekpanithanpong, U., Supamattaya, K., Sriurairatana, S., Flegel, T. (1993) Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, **17**: 145-157.
- (37) Lu, Y., Tapay, L., Brock, J., Loh, P. (1994) Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *Journal of Fish Diseases*, **17**: 649-656.

- (38) Pantoja, C. and Lightner, D. (2003) Similarity between the histopathology of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Syndrome Virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture*, **218**: 47-54.
- (39) Walker, P., Cowley, J., Spann, K., Hodgson, R., Hall, M., Withyachumrerkul, B. (2001) Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. In: The New Wave, Proceedings of Special Session on Sustainable Shrimp Culture, *Aquaculture 2001*, Browdy C. L. & Jory D. E., eds. *The World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, USA, Pp. 292-302.
- (40) Walker, P., Bonami, J., Boonsaeng, V., Chang, P., Cowley, J., Enjuanes, L., Flegel, T., Lightner, D., Loh, P., Snijder, E., Tang, K. (2004) *Roniviridae*. In: Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV, Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A., eds. *Elsevier/Academic Press*, London, Pp. 973-977.
- (41) Bell, T. and Lightner, F. (1984) IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**: 185-194.
- (42) Primavera, J. and Quintio, E. (2000) Runt-deformity syndrome in

cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J Crustac Biol*, **20**: 796-802.

- (43) Withyachumnarnkul, B., Chayaburakul, K., Lao-Aroon, S., Plodpai, P., Sritunyalucksana, K., Nash, G. (2006) Low impact of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) on growth and reproductive performance of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **69**: 129-136.
- (44) Lightner, D., Redman, R., Bell, T. (1983b) Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J Invertebr Pathol*, **42**: 62-70.
- (45) Kalagayan, G., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J., Brock, J. (1991) IHHN virus as an etiological factor in runt deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J World Aquacult Soc*, **22**: 235-243.
- (46) Lightner, D. and Redman, R. (1998) Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**: 201-220.
- (47) Jimenez, R. (1992) Síndrome de Taura (resumen). *Aquacultura del Ecuador*, Guayaquil, **1**: 1-16.
- (48) Lightner, D. (1996a) Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas.

Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties,
15: 579-601.

- (49) Hasson, K., Lightner, D., Poulos, B., Redman, R., White, B., Brock, J., and Bonami, J-R. (1995) Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms*, **23**: 115-126.
- (50) Overstreet, R., Lightner, D., Hasson, K., McIlwain, S. & Lozt, J. (1997) Susceptibility to Taura syndrome virus of some penaeid shrimp species native to the Gulf of Mexico and the Southeastern United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, **69**: 165-176.
- (51) Yu, C. & Song, Y. (2000) Outbreaks of Taura syndrome virus in pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathology*, **35**: 21-24.
- (52) Mari, J., Poulos, B., Lightner, D. and Bonami, J-R. (2002) Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. *Journal of General Virology*, **83**: 915-926.
- (53) O.I.E. (Office International des Epizooties) (2003) Síndrome de Taura. *In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. O.I.E., Paris.

- (54) Poulos, B., Tang, K., Pantoja, C., Bonami, J-R. and Lightner, D. (2006) Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology*, **87**: 987-996.
- (55) Andrade, T., Srisuvan, T., Tang, K. and Lightner, D. (2007) Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, **264**: 9-15.
- (56) Nibert, M. (2007) "2A-like" and "shifty heptamer" motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. *Journal of General Virology*, **88**: 1315-1318.
- (57) Farfante, P. and Kensley, B. (1997) Penaeoid and sergestoid shrimp and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. *Mem. Mus. Natl. Hist. Nat.*, **175**: 1-233.
- (58) Nunes, A., Martins, P. and Gesteira, T. (2004) Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). *Panorama da Aqüicultura*, 37-51.
- (59) Lightner, D., Redman, R., Bell, T., Brock, J. (1983a) Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J World Maric Soc*, **14**: 221-225.

- (60) Tang, K. and Lightner, D. (2002) Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Diseases of Aquatic Organisms*, **49**: 93-97.
- (61) Berns, K., Bergoin, M., Bloom, M., Lederman, M., Muzuczka, N., Sielg, G., Tal, J., Tattersall, P. (1995) *Parvoviridae*: VIth report of international committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol Suppl*, **10**: 169-178.
- (62) Bonami, J., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M., Lightner, D. (1990) Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J Gen Virol*, **71**: 2657-2664.
- (63) Mari, J., Bonami, J., Lightner, D. (1993) Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J Gen Virol*, **74**: 2637-2643.
- (64) Shike, H., Dhar, A., Burns, J., Shimizu, C. Jousset, F., Klimplel, K., Bergoin, M. (2000) infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimps is related to mosquito *Brevdensoviruses*. *Virology*, **277**: 167-177.

- (65) Nunan, L., Poulos, B., Lightner, D. (2000) Use of Polymerase Chain Reaction for the Detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in Penaeid Shrimp. *Marine Biotechnology*, **2**: 319-328.
- (66) Afanasiev, B., Galyov, E., Buchatsky, L., Kozlov, Y. (1991) Nucleotide sequence and genomic organization of *Aedes densonucleosis* virus. *Virology*, **185**: 323-336.
- (67) Dhar, A., Lakshman, D., Natarajan, S., Thomas, F. and van Beek, N. (2007) Functional characterization of putative promoter elements from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimp and in insect and fish cell lines. *Virus Research*, doi: 10.1016/j.virusres.2007.03.007.
- (68) Tang, K. and Lightner, D. (2006) Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Research*, **118**: 185-191.
- (69) Berns, K. (1990) Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* **54**: 316-329.
- (70) O.I.E. (Office International des Epizooties) (2000) Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa. *In: Aquatic Animal Disease Cards*. O.I.E., Paris.

- (71) Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Rodríguez, J., Miranda, P., Borja, O., Serrano, J., Terreros, M., Montalvo, K., Narváez, A., Tenorio, N., Cedeño, V., Mialhe, E., Boulo, V. (2003) Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**: 57-70.
- (72) Morales-Covarrubias, M., Nunan, L., Lightner, D., Mota-Urbina, J., Garza-Aguirre, M., Chavez-Sanchez, M. (1999) Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in wild adult blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the northern gulf of California. Mexico. *J Aquat Anim Health*, **11**: 296-301.
- (73) Tijssen, P., Bergeron, J., Dubuc, R., Hebert, B. (1995) Minor genetic changes among porcine parvovirus groups are responsible for major distinguishing biological properties. *Semin Virol*, **6**: 319-328.
- (74) Fox, J., McCrackin, S., Bloom, M. (1999) Replication of Aleutian mink disease parvoviruses *in vitro* is influenced by residues in the VP2 protein. *J Virol*, **73**: 8713-8719.
- (75) Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S., Obermanier, B., Veijalainen, P., Parrish, C. (1995) Evolution of the feline subgroup parvoviruses and the control of canine host range *in vitro*. *J Virol*, **69**: 4702-4710.
- (76) Hemauer, A., Poblitzki, A., Gigler, A., Cassinotti, P., Siegl, G., Wolf,

- H., Modrow, S. (1996) Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *J Gen Virol*, **77**: 1781-1785.
- (77) Rodríguez, I. and Barrera, H. (2004) La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, **7**: 323-335.
- (78) Maftah, A. and Julien, R. (1996) *Biologie Moléculaire*. Masson, Paris. Pp. 101, 120-126.
- (79) Cáceres, J., Vásquez, R., García, A. (2006) Diagnóstico de enfermedades infecciosas en organismos acuáticos cultivados, más que una técnica. *Programa Nacional de Sanidad Acuicola*, **9**: 1-4.
- (80) Lightner, D., Poulos, B., Bruce, L., Redman, R., Nunan, L., Pantoja, C., Mari, J., Bonami, J. (1994) Development and application of genomic probes for use as diagnostic and reserch reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHHNV and HPV, and the baculoviruses MBV and BP. *In*: Peterson MS (ed) US marine shrimp farming program 10th anniversary review. *Gulf Coast Research Laboratory Spec Publ*, Gulf Research Reports No. 1, Ocean Springs MS, Pp. 59-85.
- (81) Poulos, B., Nunan, L., Mari, J., Swider, J., Lightner, D. (1995) Use of the polymerase chain reaction to detect viral infections in penaeid

shrimp. *In*: Browdy CL, Hopkins JS (eds) Swimming through troubled water. Proc Spec Sess Shrimp Farming, Aquaculture '95. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, Pp. 238-239.

- (82) Tang, K., Poulos, B., Wang, J., Redman, R., Shih, H. and Lightner, D. (2003a) Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, **53**: 91-99.
- (83) Tang, K., Durand, S., White, B., Redman, R., Mohny, L. and Lightner, D. (2003b) Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus-a preliminary study. *Aquaculture*, **216**: 19-29.
- (84) Veloz, N. (2008) Desarrollo de un sistema anidado para la detección del virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) en la especie *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Grado, ESPOL.
- (85) Higuchi, R., Fokler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, **11**: 1026-1030.
- (86) Tang, K. and Lightner, D. (2001) Detection and quantification of

infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis Aquat Org*, **44**: 79-85.

- (87) Wong, M. and Medrano, J. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, **39 (1)**: 75-85.
- (88) Dhar, A., Roux, M., Klimpel, K. (2001) Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot virus (WSV) of shrimp by real-time quantitative PCR and SYBR chemistry. *J Clin Microbiol*, **39**: 2835-2845.
- (89) Sambrook, J. and Russell, D. (2001) Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Volumen 1. Third Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, USA.
- (90) Bedoya, C. (1996) Desarrollo y análisis de sondas nucleicas como herramientas de diagnóstico en la larvicultura de camarones Penaeidos. Tesis de Grado, ESPOL.
- (91) Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., Sáez, F. (2003) Biología Celular. Segunda edición. *McGraw-Hill - Interamericana de España*, S.A.U. Pp. 17.
- (92) Janeway, C., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2001) Immuno Biology. Fifth edition. *Garland Science*.

- (93) Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., Clarke, N. (2002) *Biochemistry*, Fifth edition. *W. H. Freeman and Company*.
- (94) Intorasoot, S., Tanaka, H., Shoyama, Y. and Leelamanit, W. (2007) Characterization and diagnostic use of a recombinant single-chain antibody specific for the gp116 envelop glycoprotein of Yellow head virus. *J Virol Methods*, **143(2)**: 186-93.
- (95) Liu, W., Wang, Y., Tian, D., Yin, Z. and Kwang, J. (2002) Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). *Dis Aquat Organ*. **49(1)**: 11-18.
- (96) Duerr, J. (2006) Immunohistochemistry WormBook, ed. The C. elegans Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.105.1, <http://www.wormbook.org/>.
- (97) Carbajal, A. (2007) Ruta de infección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) mediante infección via oral. Tesis de grado. Universidad de Sonora, División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
- (98) Técnicas Moleculares en Acuicultura (2006) Centro Nacional de Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL).

- (99) Poulos, B., Pantoja, C., Bradley-Dunlop, D., Mohny, L., Lightner, D. (2001) Developmente and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org*, **47**: 13-23.
- (100) Wu, J. and Muroga, K. (2004) Apoptosis does not play a important role in the resistance of "immune" *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, **27**: 15-21.
- (101) O.I.E. (Office International des Epizooties) (2006) Yellowhead Diseases. *In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic animals*. O.I.E., Paris.
- (102) Erickson, H., Poulos, B., Tang, K., Bradley-Dunlop, D. and Lightner, D. (2005) Taura syndrome virus from Belize represents a unique variant. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64**: 91-98.