

Detección molecular de enfermedades virales que afectan el desarrollo del cultivo del camarón*

Molecular detection of viral diseases affecting shrimp farming development*

Jorge de la Rosa-Vélez¹
y Jean-Robert Bonami²

1. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California.
Km 103 Carretera Tijuana-Ensenada. Ensenada, B.C. 22860. México. E-mail: jdrosa@uabc.mx
2. Pathogens and Immunity. ECOLAG, UMR 5119, CNRS/UM2, cc 093. Université Montpellier 2.
Place Eugène Bataillon. 34095 Montpellier, France. Cedex 05. E-mail: bonami@univ-montp2.fr

*Esta revisión está dedicada a la memoria del Dr. Francisco Contreras Espinosa (1948-2005), maestro, colega y amigo.

De la Rosa-Vélez, J. y J. R. Bonami. 2006. Detección molecular de enfermedades virales que afectan el desarrollo del cultivo del camarón. *Hidrobiológica* 16 (3): 275-293.

RESUMEN

El cultivo de camarón, como actividad productiva, ha tenido un crecimiento exponencial en los países costeros de la franja tropical y subtropical, impulsado por el desarrollo de diversas tecnologías. Sin embargo, aún persiste un importante reto para lograr mayor certidumbre de los rendimientos: erradicar las devastadoras epizootias provocadas por agentes virales. Son 15 los virus que hasta el momento han provocado los peores desastres económicos en granjas de los hemisferios este y oeste. Una serie de métodos tradicionales de diagnóstico han sido empleados para detectar la presencia y evaluar la prevalencia de virus patógenos en las diversas especies de camarón llevadas al cultivo, aunque su especificidad, sensibilidad, oportunidad y eficacia son cuestionadas. En contraste, se describe la opción de las herramientas moleculares como alternativa más adecuada para la detección oportuna y el diagnóstico específico, con muy alta sensibilidad y sencillez de interpretación. En el presente trabajo se presenta la manera en que se diseñan y construyen los iniciadores específicos y las sondas moleculares. Asimismo, se describen los métodos que emplean las mencionadas herramientas con el propósito de detectar y diagnosticar la presencia de agentes virales en tejidos selectos de camarón: la amplificación de fragmentos genómicos selectos mediante el uso de oligonucleótidos iniciadores específicos para la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) o la PCR en tiempo real (qPCR) y la hibridación de sondas moleculares específicas sobre soporte sólido (Dot-Blot) o *in situ*. Finalmente, se propone una estrategia de control sanitario para la erradicación de las epizootias de origen viral, basada en la aplicación adecuada y sistemática de los métodos de detección que emplean herramientas moleculares.

Palabras clave: Sondas moleculares, iniciadores, diagnóstico, virus, camaronicultura.

ABSTRACT

Shrimp farming, as a productive activity, has had an exponential growth in coastal countries from the tropical and subtropical stripe, boosted by the development of several technologies. However, an important challenge still remains in order to achieve a greater yielding certainty: to eradicate the devastating epizootics provoked by viral agents. About 15 viruses are the cause of the worst economical disaster in farms from the Eastern and Western hemispheres. Several traditional diagnostic methods have been employed to detect the presence and assess the prevalence of pathogenic viruses in diverse cultured shrimp species, although their specificity, sensitivity, opportunity, and efficacy

are questioned. On the other hand, molecular tools offer opportune detection, and specific diagnostics due to their high sensitivity, and easiness of interpretation. The designing of specific primers, and molecular probes is described. The methods used by the mentioned tools pursuing the detection and diagnose of the presence of viral agents in shrimp's selected tissues are also described: amplification of selected genomic fragments by the use of specific primers in the polymerase chain reaction (PCR) or real-time PCR (qPCR), and specific hybridization molecular probes onto solid support (Dot-Blot) or *in situ* hybridization. Finally, a sanitary control strategy to eradicate the viral origin epizootics is proposed, based on the adequate and systematic application of methods employing molecular tools.

Key words: Molecular probes, primers, diagnostic, virus, shrimp farming.

INTRODUCCIÓN

El camarón como recurso ha sido intensamente explotado en sus poblaciones naturales, llegando, a finales del siglo pasado, a sus límites en cuanto a rendimiento por captura en cuerpos de agua y altamar (Ocean Garden, 2001). Ante una demanda sostenida en el ámbito mundial, la camaronicultura se ha convertido en la respuesta al mercado creciente y globalizado, contribuyendo en 1999 con el 26 % de la producción mundial de camarón, evaluada en 3.2 millones de toneladas (Banco de México-Fira, 2001) y con el 30 % en 2003, cuando la producción total de camarón fue calculada en 5.2 millones de toneladas (Sabatini & O'Sullivan, 2004).

En particular, a partir de 1980 el cultivo de camarón ha presentado un desarrollo expansivo con un incremento de alrededor de 50 000 t en ese año, a 920 000 t en 1994 (New, 1997), 814 250 t en 1999 (Rosenberry, 1999) y 1.6 millones de toneladas en 2003 (Sabatini & O'Sullivan, *op. cit.*). Asia destaca entre los productores con un aporte del 80 % de la producción mundial por cultivo. En 1999, Tailandia, China, Indonesia e India se ubicaron dentro de los cinco primeros lugares en producción, con Ecuador, el productor americano más importante, ocupando el cuarto lugar (Fuchs *et al.*, 1999).

Actualmente, la aportación de camarón cultivado por parte de Asia sigue siendo mayoritaria, con el 75 %, ocupando China, Tailandia e Indonesia los tres primeros sitios en producción, mientras que el 25 % restante es cultivado en América, donde Brasil, Ecuador y México ocupan los sitios más destacados (Sabatini & O'Sullivan, *op. cit.*).

La producción mundial de camarón en cultivo recae principalmente en seis especies: *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 (camarón tigre, 56 %), *P. merguensis* De Man, 1888 (camarón blanco asiático, 17 %), *P. vannamei* Boone, 1931 (camarón blanco occidental, 16 %), *P. chinensis* Osbeck, 1865 (camarón

blanco chino, 6 %), *P. stylirostris* Stimpson, 1871 (camarón azul occidental, 4 %) y *P. japonicus* Bate, 1888 (camarón kuruma, 1 %) (Rosenberry, 2001), aunque la tendencia a globalizar el uso de *P. vannamei* es muy fuerte y se anticipa su cultivo generalizado en la mayoría de las granjas asiáticas en los próximos años (Briggs *et al.*, 2004).

El camarón tigre es muy apreciado por la talla máxima que alcanza (hasta 363 mm), aunque aún existen dificultades para su reproducción en cautiverio, lo que lo hace fuertemente dependiente del suministro limitado de larvas del medio natural, y es muy sensible a los agentes patógenos virales (virus del síndrome de la mancha blanca, o WSSV, y virus de la cabeza amarilla, o YHV, por ejemplo).

El camarón blanco asiático se ha convertido en fechas recientes en una especie preferente para el cultivo en granjas extensivas del sudeste de Asia, debido a su amplia tolerancia a las aguas de baja calidad, a las altas densidades en que puede ser desarrollado y a su gran disponibilidad en el medio natural. Asimismo, es uno de los pocos peneidos que alcanza la madurez sexual en estanques de cultivo.

El camarón blanco occidental es nativo de la costa del Pacífico de las Américas. Ha sido la especie de elección en Ecuador y la mayoría de las granjas latinoamericanas. Su talla máxima es de 230 mm y es una especie cuyo cultivo es más sencillo en comparación con *P. monodon*. Por ese motivo, recientemente China y Taiwan han importado lotes de esta especie para experimentar su cultivo en esas regiones asiáticas.

El camarón azul occidental también es nativo de la costa del Pacífico, desde México hasta Perú. Fue la especie de elección para cultivo en diversas granjas del hemisferio occidental hasta finales de los años ochenta, cuando el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética, o IHHNV, devastó casi completamente los cultivos. Este camarón se asemeja al

1 En este artículo se emplean los nombres tradicionales del género *Penaeus*, en virtud de que en el trabajo de Pérez-Farfante & Kensley (1997), donde se propone elevar a género los subgéneros *Litopenaeus*, *Farfantepenaeus*, *Fenneropenaeus* y *Marsupenaeus*, no se ofrece explicación alguna que justifique ese hecho.

blanco occidental en cuanto a calidad culinaria, aunque su cultivo es más exigente en términos de mejor calidad de agua, mayor concentración de oxígeno y requerimientos cuantitativos de alimento; no obstante, a su favor está la mayor tolerancia a temperaturas bajas.

El camarón blanco chino es un camarón de las costas de China y Corea que crece muy bien a temperaturas bajas. Tolera fondos fangosos y baja salinidad. Su talla máxima es más pequeña que los otros peneidos cultivables (183 mm) y necesita altos niveles de proteína.

El camarón kuruma es nativo del Océano Índico y el Pacífico Sudoccidental. Esta especie se cultiva predominantemente en Japón y Australia en fondos arenosos y agua de alta calidad. Sus dieta incluye un alto contenido de proteínas. Su mercado se limita a Japón.

La camaronicultura basada en estas especies se ha venido desarrollando en un ciclo de "auge y fracaso". A pesar de que se han logrado importantes avances en cuanto a: 1) el conocimiento y manipulación del ciclo biológico del camarón, 2) el diseño de sistemas de cultivo más eficientes y eficaces, y 3) los requerimientos nutricionales de las distintas especies en cultivo, se considera que, en comparación con la crianza de animales terrestres, la domesticación del camarón está apenas en sus inicios (Nauen, 1999). Por añadidura, la camaronicultura enfrenta retos muy importantes en cuanto a su ubicación como actividad económica en equilibrio con el ecosistema.

El establecimiento de granjas en la zona costera de las regiones tropicales ha infligido un severo castigo a los ecosistemas de manglar, ya que ha sido práctica común la tala indiscriminada de este tipo de vegetación para asentar los complejos para el cultivo. Lo anterior ha provocado la modificación de la línea costera y el deterioro de las condiciones productivas en la franja litoral adyacente. Además, debido a la inexistencia de reglamentación sobre el ordenamiento territorial en la mayoría de los países productores, los asentamientos se han dado sin norma alguna. De esta manera, el problema de impacto ambiental que generan, particularmente en ciertos puntos estratégicos, se vuelve en contra de la misma actividad camaronícola en virtud de que las aguas que libera una granja, normalmente eutrofizadas y deterioradas en su calidad, son incorporadas al sistema de las granjas vecinas provocando pérdidas en la producción (Bilio *et al.*, 1999; Fuchs *et al.*, 1999).

El último problema incluye lo que en este momento es quizá la amenaza más grave para los inversionistas en camaronicultura, es decir, la transmisión de enfermedades provocadas por diversos agentes patógenos. Y dentro de los patógenos más devastadores por su morbilidad se encuentran los virus (Lightner *et al.*, 1997).

Unos 15 virus han sido descritos como agentes infecciosos en cultivos alrededor del mundo; pero son ocho los que han provocado las epizootias más devastadoras: el virus de la necrosis infecciosa hematopoyética e hipodérmica (IHHNV), el virus hepatopancreático (HPV), el virus del síndrome de la nucleosis poliédrica de *P. vannamei* (PvSNPV, o virus tipo BP), el virus del síndrome de la nucleosis poliédrica de *P. monodon* (PmSNPV o virus tipo MBV), el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), el virus de la necrosis de la glándula digestiva (BMN), el virus del síndrome de Taura (TSV) y el virus de la cabeza amarilla (YHV) (Bonami, 1997).

El origen del IHHNV parece residir en las regiones sur y sureste de Asia, donde produjo algunas epizootias ligeras, sin grandes mortalidades. Sin embargo, en 1987 apareció en las granjas occidentales diezmando considerablemente los cultivos de *P. stylirostris* (Lightner *et al.*, *op. cit.*). En *P. vannamei* se presenta como enfermedad crónica, sin grandes mortalidades y sin signos macroscópicos notables en los adultos que superan la epizootia. No obstante, estos organismos son portadores del virus y potenciales responsables de infecciones tanto verticales (presente en el genoma de los huevos) como horizontales (ingestión de heces o canibalismo) (Lightner, 1996 a).

HPV es otro virus de origen asiático, descrito a partir de las epizootias producidas en las especies nativas en cultivo (*P. chinensis*, *P. merguensis*, *P. monodon*, etc.). Su presencia en América se explica por la importación de peneidos del Indopacífico (Lightner, 1993). Las epizootias en que se ha visto involucrado este virus generan síntomas gruesos que pudieran no estar directamente relacionados con el virus, ya que siempre se detectaron otros patógenos oportunistas. También se han descrito organismos con severas infecciones por HPV que no presentan síntoma alguno (Lightner, *op. cit.*).

PvSNPV es el virus que se conoció como *Baculovirus penaei*. Se trata del primer virus descrito en la literatura que afecta a los camarones (Couch, 1974). Se describió originalmente en *P. duorarum* Burkenroad, 1939, una especie nativa del Golfo de México. Posteriormente se diseminó hacia las granjas camaroneras de prácticamente toda América (Florida, Texas y hasta Hawai, de los Estados Unidos, Brasil, Panamá, Perú, Costa Rica, Honduras y México), donde se cultivaban diversas especies tales como *P. stylirostris*, *P. vannamei*, *P. aztecus* Ives, 1891, *P. duorarum*, *P. marginatus* Randall, 1840 y *P. penicillatum* Alcock, 1905 (Lightner, *op. cit.*). Los eventos epizooticos han sido graves y afectan principalmente a las fases larvarias.

PmSNPV, análogamente con PvSNPV, presenta una amplia distribución e intervalo de hospederos, sólo que en la región del Indopacífico, Japón y la costa norte de Australia. Las mortalidades reportadas son intermedias en cultivos de *P. monodon*, *P. plebejus* Hess, 1865 y *P. merguensis* (Lightner, *op. cit.*).

Las primeras descripciones del WSSV datan de principios de los años noventa del siglo pasado, en granjas del noreste de Asia. Desde entonces se ha extendido, primero a China, Corea, Tailandia, Indonesia, Vietnam, Malasia, India y Bangladesh (Lightner *et al.*, 1997) y después a todo el mundo donde haya un cultivo de camarón. Las primeras epizootias se presentaron en *P. monodon*, pero después el virus demostró ser capaz de infectar prácticamente a cualquier especie de peneido y a cualquier tipo de decápodo (Peng *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). En contraste con el WSSV, BMN parece ser un virus específico de *P. japonicus*, en donde produce severas epizootias en estadios de poslarva, con muy altas mortalidades (>98 %) (Lightner, 1993).

Un virus de origen americano que provocó grandes mortalidades en granjas camaroneras al inicio de los años noventa del siglo pasado fue TSV. Descrito por primera vez en las granjas que se encuentran en la ribera del río Taura, en Ecuador, se diseminó rápidamente hacia otras granjas latinoamericanas debido muy probablemente al comercio de larvas, poslarvas y reproductores. Su principal blanco han sido los cultivos de *P. vannamei*, donde afecta principalmente a poslarvas que sufren mortalidades masivas. Los organismos que superan los 5.0 g crecen normalmente pero con manchas melánicas, y se sospecha que son portadores del virus (Lightner *et al.*, 1995). Se ha detectado en las poblaciones silvestres de las costas de Ecuador, Honduras, El Salvador y México (Lightner, 1996 b).

Otro virus descrito al final del siglo pasado en granjas de Tailandia, donde se cultiva *P. monodon*, es el YHV. Según la literatura, puede ser considerado como el virus que infecta al camarón con mayor morbilidad jamás antes descrito (Lu *et al.*, 1994). En las epizootias producidas por YHV, la mortalidad fue del 100 % en escasos 3-5 días posterior a la introducción del virus (Boonyaratpalin *et al.*, 1993). En cultivos experimentales de *P. vannamei* y *P. stylirostris*, se repitió el mismo patrón de mortalidad (Lu *et al.*, 1994); sin embargo en Tailandia y la India, en cultivos donde se encuentran mezclados *P. monodon*, *P. indicus* H. Milne Edwards, 1837 y *P. merguensis*, las dos últimas especies no mostraron síntoma alguno de la enfermedad, mientras que la primera especie sucumbía víctima de la enfermedad de la cabeza amarilla. Este resultado se interpretó como especificidad del hospedero (Mohan *et al.*, 1998).

Dada la amenaza constante de la aparición repentina y devastadora de algún agente infeccioso de naturaleza viral, el crecimiento sostenido de esta pujante industria mundial depende fundamentalmente de poder establecer un control sanitario efectivo que evite la dispersión de los virus, tanto entre las granjas como hacia el medio natural. Para contrarrestar la causa de las potenciales pérdidas en la producción camaronícola por el efecto de las epizootias virales, la Biología Molecular ofrece una opción que puede representar la solución definitiva para detener la diseminación de los virus en y entre las granjas camaroneras.

Se trata de las herramientas moleculares diagnósticas, las cuales pueden desempeñar un papel preponderante en la consecución de esta meta.

En esta contribución, se revisaron las herramientas tradicionales empleadas para el diagnóstico de epizootias virales, se describe el diseño y la construcción de las herramientas moleculares, se propone éstas como una alternativa más específica, sensible, oportuna y eficaz para la detección y diagnóstico de agentes virales y, finalmente, se sugiere una estrategia de control sanitario para frenar la dispersión globalizada de los agentes virales alrededor del mundo.

LOS MÉTODOS TRADICIONALES DE DIAGNÓSTICO

Hasta antes de 1993, cuando se publicó la primera sonda útil para detectar y diagnosticar la presencia de IHHNV (Mari *et al.*, 1993), sólo se contaba con métodos tradicionales de diagnóstico. En nuestros días, aún se siguen aplicando estos métodos para la diagnosis en ciertas regiones, aunque presentan la problemática que se describirá a continuación.

Entre los métodos para estudiar las enfermedades producidas por virus, llamados "clásicos" por los patólogos especialistas en camarón, se cuentan los diagnósticos basados en signos generales y clínicos, observaciones al microscopio de contraste de fases o de campo claro de preparaciones de tejido en fresco, histología e histoquímica y, más recientemente, microscopía electrónica de transmisión (Lightner & Redman, 1998) (ver Tabla I).

Estos métodos están basados en una larga tradición médica que implica el desarrollo de capacidades de observación y comparación entre tejidos sanos (o "normales") y enfermos (o "afectados por una patología"). Implica, asimismo, la capacitación en algunas técnicas básicas de disección, fijación de tejidos, tinción y operación de microscopios de luz y electrónicos. De lo anterior se deduce que la obtención de un determinado grado de pericia para el diagnóstico estará dictada por el desarrollo de lo que, en algunos círculos médicos, se conoce como "ojo clínico". Por añadidura, la probabilidad de observar tanto los signos generales macroscópicos, como los cambios patológicos en los tejidos, requiere que la infección esté claramente establecida.

En el caso de los camarones en cultivo, la mayoría de las veces, dadas las condiciones en que se cultivan estos organismos (lotes depauperados genéticamente homogéneos, hacinamiento y condiciones en el estanque alteradas respecto a las del medio natural), el diagnóstico se logra una vez que la producción ya ha sido barrida por una epizootia. Este riesgo se deduce de lo comentado por Bruce *et al.* (1994 a) cuando comparan la oportunidad de detección del virus PvSNPV (virus tipo *Baculovirus penaei*)

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

| | Sensibilidad ¹ | Especificidad ² | Oportunidad ³ | Experiencia requerida ⁴ | Costo ⁵ |
|--|---------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------|
| Técnicas diagnósticas clásicas. | | | | | |
| Observación macroscópica de signos gruesos | + | + | - | +++ | - |
| Observación de tejido fresco al microscopio. | + | + | - | +++ | + |
| Histología e histoquímica | ++ | ++ | - | +++ | ++ |
| Observación al microscopio electrónico de transmisión. | ++++ | +++ | + | ++++ | ++++ |
| Técnicas diagnósticas moleculares. | | | | | |
| Uso de sondas moleculares. | | | | | |
| Gota inmovilizada sobre soporte sólido (Dot-blot) | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | ++ |
| Hibridación in situ | ++++ | ++++ | +++ | ++ | ++ |
| Uso de iniciadores específicos. | | | | | |
| PCR a partir de ácidos nucleicos purificados. | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | ++++ |

Escala:

- Nulo o despreciable.
- + Muy bajo
- ++ Bajo
- +++ Intermedio
- ++++ Alto
- +++++ Muy alto

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

durante una infección experimental, mediante la “clásica” observación de cuerpos de inclusión tetraédricos en preparaciones en fresco, los cuales son evidentes hasta 18-24 horas después de la infección, en comparación con otros métodos, como histología o sondas moleculares, que son capaces de detectar la presencia del agente infeccioso en tan sólo 12 horas postinyección.

De igual forma, en virtud de que es factible introducir al cultivo estadios de desarrollo que no muestran síntomas de la enfermedad, así como organismos que no los mostrarán nunca, pero que pueden ser transmisores potenciales de ésta, el empleo rutinario para la prevención de enfermedades causadas por virus por esos medios de detección y diagnóstico queda en notoria desventaja ante métodos más oportunos, específicos, sensibles y eficaces.

La microscopía electrónica de transmisión, combinada con técnicas de concentración de virus a partir de homogeneizados de tejido mediante ultracentrifugación, puede ser considerada más eficaz que los demás métodos mencionados, aunque tiene la enorme desventaja del costo del equipamiento, lo que la convierte en una técnica adecuada para la investigación, pero difícilmente propia para el diagnóstico de rutina (ver Tabla I).

No obstante lo anterior, la detección oportuna y el diagnóstico específico de las enfermedades virales en camarones en cultivo no es un callejón sin salida. Con base en las características moleculares de los genomas de los virus ha sido factible

desarrollar estrategias de aproximación más útiles basadas en la naturaleza bioquímica de esos agentes patógenos.

HERRAMIENTAS MOLECULARES DIAGNÓSTICAS: DEFINICIONES

Son dos los métodos principales que emplean herramientas moleculares para detectar y diagnosticar la presencia de ADN de agentes virales en muestras de camarón: 1) amplificación de fragmentos genómicos selectos mediante el uso de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) específicos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o PCR en tiempo real (qPCR) y 2) hibridación de sondas moleculares específicas sobre soporte sólido (Dot-Blot) o *in situ*.

Ambos métodos emplean herramientas moleculares que tienen un origen de diseño común: se trata de secuencias de fragmentos del genoma de cada virus que se desea estudiar, los cuales han sido purificados y clonados en algún sistema vector-bacteria útil para ese propósito.

Las herramientas moleculares para la detección y el diagnóstico de enfermedades producidas por virus tienen las siguientes ventajas sobre los métodos tradicionales (ver Tabla I):

a) Son específicas. Debido a que su diseño y construcción se basan en fragmentos de secuencias del propio genoma viral,

el reconocimiento de la presencia de un virus determinado en tejidos del camarón no tiene lugar a dudas. Esta aseveración se basa en el hecho de que es en el genoma particular de cada virus donde residen las instrucciones específicas para su funcionamiento bioquímico y fisiológico. No obstante, se debe ser muy cuidadoso al elegir la región genómica que servirá a manera de molde para el diseño de la herramienta debido a que existen regiones conservadas en el nivel de familia que, al ser elegidas, pudieran dar falsos positivos. Por lo tanto, es imprescindible conocer previamente la organización del genoma del virus en cuestión y conocer la función de cada gen para poder elegir adecuadamente de dónde se partirá para la construcción de la herramienta molecular.

b) Son sensibles. Dado que el reconocimiento de la presencia viral se hace en el nivel molecular, basta con que exista una pequeña cantidad del virus en cuestión para que su genoma pueda ser amplificado por PCR (en cantidades del orden de los femtomoles) o hibridado con una sonda molecular (en cantidades del orden de los picomoles, si se emplea alguna molécula reportera que revele colorimétrica o fluorométricamente).

c) Son oportunas. Gracias a su sensibilidad, las herramientas moleculares pueden detectar la presencia de virus en etapas muy tempranas de la infección. Además, los protocolos de aplicación, tanto para la técnica de PCR como de Dot-Blot, son de muy corta duración (en el orden de las 12-24 horas), comparadas con las tradicionales. Lo anterior las hace sumamente oportunas para emitir un diagnóstico. Adicionalmente, estos métodos no son destructivos, ya que en juveniles y adultos basta con contar con algunos microlitros de hemolinfa o un par de pleópodos, para poder llevarlas a cabo.

d) Son eficaces. La interpretación de los resultados es sencilla y sin ambigüedades, si se cuenta con los controles ade-

cuados. Los métodos no requieren del desarrollo de capacidades de observación y reconocimiento de signos y síntomas variables, ni de extensa experiencia en la identificación de subestructuras celulares y tisulares, como lo exigen, por ejemplo, las técnicas histopatológicas.

Oligonucleótidos iniciadores.

Por estas herramientas se entiende un par de secuencias de 18 a 30 nucleótidos que flanquean un gen o una región altamente característica del virus que se desea detectar. El par de iniciadores se compone del llamado "hacia delante" (*forward*), que corresponde a los 18-30 nucleótidos de secuencia complementaria al inicio de la región de interés, en el sentido 3'-5' de la hebra de ADN, y el "hacia atrás" (*reverse*) que es una secuencia también de 18-30 nucleótidos coincidente con la secuencia final de la región de interés, por lo tanto complementaria a la hebra de ADN en sentido 5'-3' (Fig. 1). Este par de iniciadores reciben ese nombre pues su función es precisamente iniciar o disparar la reacción de síntesis de ADN.

Sondas moleculares.

La segunda herramienta que se puede diseñar a partir del conocimiento de la secuencia y organización del genoma viral es la sonda molecular. Ésta es una secuencia, generalmente de entre 200 y 1000 pares de bases, correspondiente a una porción de algún gen del virus. De preferencia se elegirá una región genómica que sea muy característica del virus que se pretende detectar por esta vía (es decir, deberá ser una secuencia variable entre taxones virales, pero conservada dentro del taxón). Esto es lo que da la especificidad de la prueba y en ello estriba su alto poder diagnóstico.

Las secuencias que serán usadas como sonda son marcadas, ya sea mediante radiactividad (^{32}P) o con moléculas



Figura 1. Complementariedad específica de los iniciadores "hacia delante" o *forward* y "hacia atrás" o *reverse* con el ADN molde.

reporteras (p. ej. digoxigenina) (Fig. 2). El avance en la tecnología de las marcas no isotópicas a partir de 1992 ha hecho caer en desuso el marcaje radiactivo, el cual es problemático para los laboratorios estándar tanto por su manejo como por los desechos que produce (Cornett *et al.*, 1999).

Una vez conocida la secuencia del gen o la región genómica a partir del cual se construyó la sonda, es factible diseñar iniciadores que flanqueen la secuencia y generar la sonda mediante PCR, eliminando las inconveniencias de mantener las clonas que contienen como inserto el fragmento empleado como sonda (Taylor, 1993). Actualmente, existen paquetes de reactivos que incorporan la marca o molécula reportera durante el proceso de amplificación.

HERRAMIENTAS MOLECULARES DIAGNÓSTICAS: DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN

Los avances en la tecnología del ADN recombinante han permitido establecer protocolos sencillos para el diseño y construcción de herramientas moleculares.

Actualmente, está bien estandarizado el tratamiento que se debe aplicar para extraer ácidos nucleicos (ADN y/o ARN)

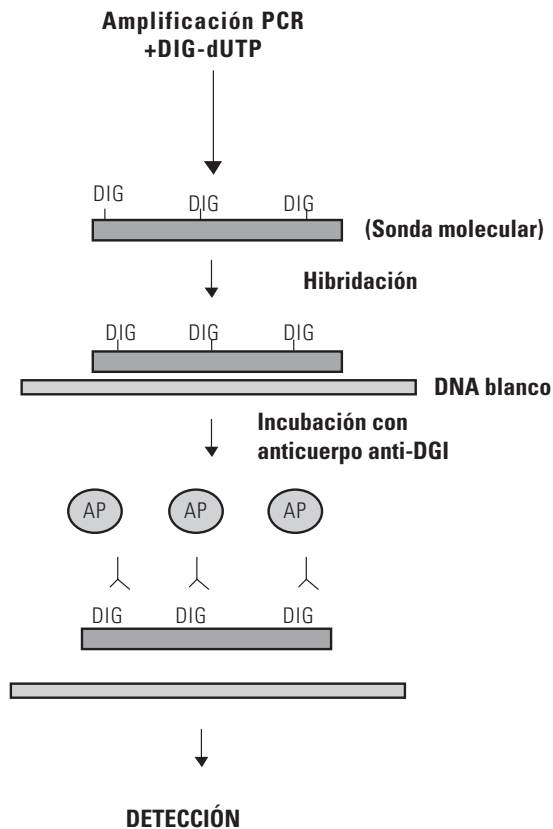


Figura 2. Esquema de la detección de ADN blanco mediante una sonda molecular marcada con digoxigenina, sometida a hibridación molecular. DIG: digoxigenina; AP: anti-DIG + fosfatasa alcalina.

de buena calidad y en cantidad, de prácticamente cualquier tejido o microorganismo, incluidos los virus (ver p. ej. Sambrook *et al.*, 2001). El genoma de estos últimos, ya sea de ADN o ARN retrotranscrito como ADNc, puede ser clonado y posteriormente secuenciado, para elaborar sondas diagnósticas o iniciadores útiles en la detección de la presencia del virus que dio origen a las herramientas moleculares.

A continuación, se presenta de manera resumida, el proceso de diseño y construcción común empleado en nuestros laboratorios.

Clonación del material genómico.

El punto de partida para la clonación del material genómico es contar con una cantidad suficiente de virus que permita la obtención de ácidos nucleicos en concentración y calidad adecuadas. En el caso de los virus que infectan camarones, lo anterior se logra mediante una infección experimental de especímenes vivos, íntegros y sanos; en virtud de que no existen, hasta este momento, líneas celulares de camarón adecuadas para el propósito que se persigue (algunos intentos poco exitosos han sido publicados, cf. Lu *et al.*, 1995; Toullec *et al.*, 1996; Sano, 1998).

De los camarones muertos por la infección, se colecta la hemolinfa y se congela el espécimen (a -80°C), cuyos tejidos podrán ser también fuente de virus para la purificación de su genoma. A continuación, la hemolinfa u otro tejido (generalmente se emplean los órganos blanco del agente viral infeccioso), se homogeneizan en un amortiguador a pH adecuado. Los homogeneizados se aclaran mediante centrifugaciones sucesivas a baja velocidad (en forma creciente, en dos o tres pasos, de $4\,000 \times g$ a $20\,000 \times g$), para precipitar, finalmente, el paquete viral a $200\,000 \times g$ (Bonami *et al.*, 1990; 1995; 1997); éste se separa de los demás componentes celulares y el material de desecho mediante ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa. La banda que contiene al virus, la cual se visualiza gracias a la difracción que produce cuando se ilumina con una fuente de luz blanca externa (Fig. 3), se extrae pinchando el tubo de centrifuga con una jeringa estéril. Una segunda purificación es factible, empleando gradientes de densidad con CsCl, en aquellos virus que poseen cápsides resistentes (virus poliédricos) (Bonami *et al.*, 1990).

En este punto es muy útil observar al microscopio electrónico de transmisión la calidad y cantidad relativa de los virus purificados, como número de partículas virales por campo (Fig. 4).

El paquete viral obtenido es sometido a lisis mediante proteasas (normalmente proteinasa K) y detergentes (normalmente sarcosina) para liberar sus contenidos genómicos (Bonami *et al.*, 1990; 1995; 1997).

En el caso de virus cuyo genoma consiste en ARN, se deben tomar precauciones adicionales a las comunes (limpieza

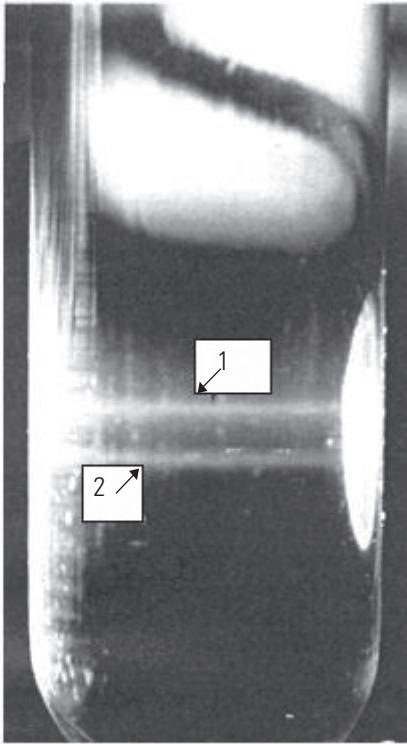


Figura 3. Separación de partículas virales (WSSV) en un gradiente de sacarosa. Tubo de centrifuga iluminado con luz blanca ortogonalmente. 1) Cápsides vacías. 2) Viriones.

exhaustiva y esterilización de todo material y reactivo) en un laboratorio de Biología Molecular. Debido a que las ARNasas son enzimas ubicuas resistentes a la desnaturalización por calor, se deberá tratar todo material y reactivo utilizado en el proceso de extracción y purificación del ARN con un inhibidor de ARNasas tal como el pirocarbonato de dietilo (DEPC) (Mari *et al.*, 1998; Tang & Lightner, 1999).

La purificación de los ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol (Sambrook *et al.*, 2001). Cuando el genoma se conforma de ADN, éste está listo para iniciar el proceso de clonación, pero en el caso de genomas de ARN habrá que sintetizar el ADNc correspondiente para poder ser clonado. Con ese objeto, se emplea la transcriptasa reversa y un iniciador "aleatorio", que consiste en una secuencia de 10 bases ordenadas al azar. Se incuba la reacción de síntesis y el ADNc obtenido se precipita con etanol (Mari *et al.*, 1998).

Para realizar la clonación es necesario insertar fragmentos del genoma (ADN o ADNc) en un vehículo para ser introducido en algún sistema bacteriano que lo incorpore y reproduzca. Este vehículo puede consistir en un plásmido o un bacteriófago. Los bacteriófagos se eligen principalmente cuando el tamaño de los insertos rebasan las decenas de miles de bases (Howe, 1995).

Cribado de la genobiblioteca.

De la clasificación cuidadosa de colonias transformadas se obtiene una genobiblioteca, biblioteca de genes o banco de genes.

El siguiente paso es cribar la genobiblioteca para elegir aquellas clonas que posean insertos de interés. Hasta este punto, se consideran de interés aquellas clonas que posean insertos mayores a 300 pb, ya que es el tamaño mínimo que puede brindar, por un lado, información sobre el genoma y, por otro, una sonda confiable y manipulable.

Cabe mencionar que una sonda será confiable en la medida que más conozcamos acerca de la organización del genoma del virus en cuestión y el origen de la secuencia empleada. Por esto se entiende, dentro de la organización genómica, el grado de conservación filogenética de la región que fue clonada para dar origen a la herramienta molecular. Existen genes en el genoma viral que definen precisamente la naturaleza de un virus en particular, y otros que son compartidos con los demás miembros de la misma familia. En caso de haber sido clonado un fragmento de estos últimos, la respuesta a la aplicación de la herramienta puede ser ambigua entre virus pertenecientes a una familia. Por

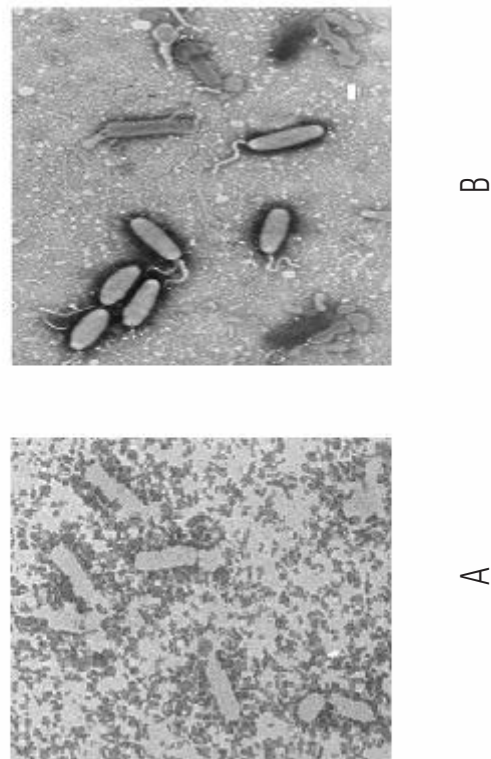


Figura 4. Micrografías electrónicas de virus productores de epizootias en camarón. A. Virus del síndrome de la cabeza amarilla (YHV) 30,000 X. B. Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) 18,000 X.

lo tanto, es muy importante asegurar que el fragmento empleado como herramienta pertenezca a un gen de los que confieren las características específicas al virus que nos interesa detectar (Zambrano-García, 2002).

Para la extracción del ADN plasmídico de las clonas que componen la genobiblioteca se utiliza una técnica comúnmente empleada en los laboratorios de Biología Molecular, que es conocida como *minipreparación* (Sambrook *et al.*, 2001). Mediante este proceso, se reduce la genobiblioteca al mínimo requerido para continuar con la caracterización de los insertos.

Amplificación y secuenciación de los insertos.

A partir de cada clona con insertos interesantes es posible obtener cantidad suficiente de cada inserto para ser caracterizada por secuenciación mediante la técnica de *minipreparación*. No obstante, es factible emplear técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, ver abajo) con este fin. Finalmente, los insertos se limpian adecuadamente.

Los insertos así preparados están listos para ser secuenciados, lo cual puede ser realizado ya sea manualmente, con un equipo de electroforesis adecuado para ello, mediante la técnica de Sanger (Sambrook *et al.*, 2001), o mediante un aparato de secuenciación automatizado, ya sea de placa o capilar.

Después de obtenidas las secuencias, se procede a "armar el rompecabezas". Una herramienta muy útil en este paso son las secuencias depositadas en bases de datos como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), DDBJ (DNA, Data Bank of Japan; www.ddbj.nig.ac.jp) y EMBL (European Bioinformatics Institute; www.ebi.ac.uk), que permiten buscar analogías y homologías que orienten la reconstrucción de la organización genómica.

A partir de esa información, se podrá elegir con mayor confiabilidad cuál será la secuencia idónea para ser usada como sonda diagnóstica para cada virus particular.

Marcaje no radiactivo.

Hasta hace aproximadamente 20 años, la única forma de marcar una secuencia de bases para ser usada como sonda era la radiactividad. Para tal efecto, se empleaba el isótopo ^{32}P , que se incorporaba con alguno de los cuatro nucleótidos (A, T, G o C) (John *et al.*, 1969; Pardue & Gall, 1969). Este procedimiento, aunque de gran utilidad en su época, presentaba los riesgos inherentes al uso de la radiactividad, y, por supuesto, su uso estaba restringido exclusivamente a aquellos laboratorios especializados que estaban específicamente equipados para el manejo de radiación, lo que lo hacía poco práctico para el diagnóstico en otro tipo de instalaciones.

A principio de los años ochenta del siglo pasado se empezó a desarrollar una nueva estrategia para el marcaje de sondas, que emplea moléculas reporteras no radiactivas. Esta estrategia

incorpora ya sea moléculas reporteras del tipo fluorocromo unidas directamente al oligonucleótido, que pueden ser visualizadas directamente (Bauman *et al.*, 1980,1984; Renz & Kurz, 1984), o bien, elementos de la inmunoquímica, empleando anticuerpos contra la molécula reportera, los cuales se acoplan con algún tipo de reacción que revele su presencia en un proceso de hibridación molecular (Bauman *et al.*, 1981; Lansdorp *et al.*, 1984; Pinkel *et al.*, 1986).

Las primeras se emplean en métodos denominados directos y la principal característica de estas moléculas es que no deben interferir con la reacción de hibridación, y, además, deben resistir las condiciones de hibridación y lavado. Las segundas participan en lo que se conoce como métodos indirectos y, como las primeras, no deben interferir en la reacción de hibridación, pero, además, deben estar accesibles a los anticuerpos. Varias modificaciones hapténicas se han desarrollado para este fin, como el sistema biotina-estreptavidina, pero, actualmente, el más empleado es el sistema que emplea la digoxigenina como molécula reportera.

El primer juego de reactivos que empleó la digoxigenina (DIG) como hapteno apareció en el mercado en 1987. Esta molécula es un esteroide aislado de las plantas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*. La DIG se une en la posición C-5 de nucleótidos de uridina, vía un brazo espaciador que contiene once átomos de carbono (Fig. 5). Los nucleótidos marcados con DIG se incorporan, con una concentración definida, a las sondas de ADN por medio de ADN polimerasas y la transferasa terminal. La marca de DIG se puede agregar por marcado aleatorio, desplazamiento de mella (*nick translation*), PCR, marcaje/terminación del extremo 3' o transcripción *in vitro*. Las sondas hibridadas marcadas con DIG se pueden detectar con anticuerpos antidigoxigenina (anti-DIG) de alta afinidad, los cuales están conjugados con fosfatasa alcalina, peroxidasa, fluoresceína, rodamina, AMCA u oro coloidal. La sensibilidad para la detección depende del método empleado para visualizar el anticuerpo conjugado. Cuando se emplea la fosfatasa alcalina con substratos colorimétricos tales como el nitroazul de tetrazolio (NBT) + la sal disódica del 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP), o fluorescentes como el fosfato de 2-hidroxi-3-ácido naftoico-2'-fenililida (HNPP), la sensibilidad de detección de la reacción es alrededor de 0.1 pg (Boehringer-Mannheim, 1996).

Diseño de iniciadores.

A partir de las sondas elaboradas y probadas, es factible diseñar iniciadores útiles para el diagnóstico por PCR.

Cuando se diseña un par de iniciadores, es importante considerar el tamaño del producto a ser amplificado. Cuanto menor sea éste, menor será el tiempo de extensión requerido y más corto el tiempo de análisis. También es importante considerar la posibilidad de formación de dímeros entre iniciadores y que éstos

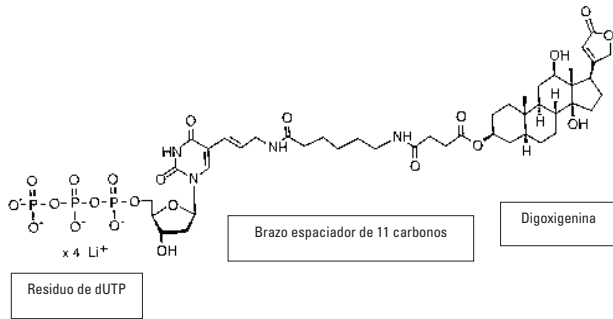


Figura 5. Digoxigenina-dUTP. El hapteno esteroide unido por un brazo espaciador de 11 carbonos a la posición 5' del anillo pirimidínico de un residuo de dUTP.

sean distinguibles del producto esperado cuando se analiza el resultado mediante electroforesis estándar (McDowell, 1999).

Existen muchas guías para el diseño de iniciadores, no obstante, el apego estricto a ellas no garantiza el éxito, así como obviar algunos consejos puede resultar en algunos casos en iniciadores de muy buen desempeño. McDowell (*op. cit.*) recomienda seleccionar un tamaño para los iniciadores de entre 20-30 bases, balancear las temperaturas de fusión del par de iniciadores, tratar de seleccionar un contenido de G+C entre el 40 y el 60 %, evitar la complementariedad entre el par de iniciadores (particularmente en el extremo 3'), evitar repeticiones de purinas, pirimidinas o motivos repetitivos, así como la presencia de regiones que posean estructuras secundarias significativas.

En la actualidad, se cuenta con un número importante de paquetes computacionales que ayudan a diseñar iniciadores. Entre los más empleados están: Oligo™, Primers® y PrimerSelect (este último perteneciente al paquete DNASTar™).

MÉTODOS MOLECULARES DE DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO

Una vez construidas las herramientas moleculares, éstas pueden aplicarse para la detección y el diagnóstico mediante métodos basados ya sea en la amplificación de un fragmento determinado de un ADN o ARN molde, o en reacciones de hibridación molecular.

Los primeros se auxilian de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), en el caso de virus con genoma de ADN; o en una modificación conocida como RT-PCR, cuando el genoma viral es una molécula de ARN. La modificación consiste en un primer paso en el que una transcriptasa reversa sintetiza el ADNc, seguido de una serie de ciclos de PCR normal. Las reacciones de hibridación aprovechan la especificidad de las sondas moleculares para formar híbridos, ya sea en gotas inmovilizadas en membranas de nylon de extractos de ácidos nucleicos (Dot-

Blot), o directamente sobre cortes histológicos finos de tejidos de camarón (hibridación *in situ*).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta reacción *in vitro* sigue la misma lógica bioquímica de la reacción de replicación del ADN *in vivo*. La doble hélice es desnaturalizada y la enzima ADN polimerasa, en presencia de desoxinucleótidos trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP y dGTP, abreviados como dNTP's), sintetiza cadenas complementarias que sigan la regla de Watson y Crick (una A se complementa con una T y una G con una C), con el resultado final de dos moléculas hijas semiconservativas (Watson, 1978). En la PCR, la reacción de síntesis de ADN se lleva a cabo en un tubo de ensaye con un medio amortiguado, donde un determinado tipo de ADN polimerasa (la *Taq* polimerasa, empleada por su característica de resistencia a las altas temperaturas) replica fragmentos cortos de ADN usando dNTP's como bloques para la síntesis (Fig. 6). Un par de oligonucleótidos iniciadores, que se unen complementariamente al ADN molde, definen el intervalo a amplificar.

La PCR utiliza el calor como agente desnaturalizante de la doble hélice. Dado que la estructura de doble cadena se mantiene por la fuerza de puentes de hidrógeno (dos entre A-T y tres entre G-C), al incrementar la temperatura (generalmente entre 94° y 95 °C), esas uniones se rompen, exponiendo la secuencia de bases del ADN molde a la presencia de los iniciadores. Al bajar la temperatura a un nivel óptimo de alineamiento de estos oligonucleótidos (dictado por su secuencia), la reacción de la polimerasa en cadena puede iniciarse. Para ello, se eleva la temperatura nuevamente a la óptima para que la *Taq* polimerasa realice su función catalítica (entre 68° y 72 °C). La repetición de este ciclo 25-40 veces produce aproximadamente 10^6 moléculas dúplex al final del proceso (McPherson & Moller, 2000). Los tres

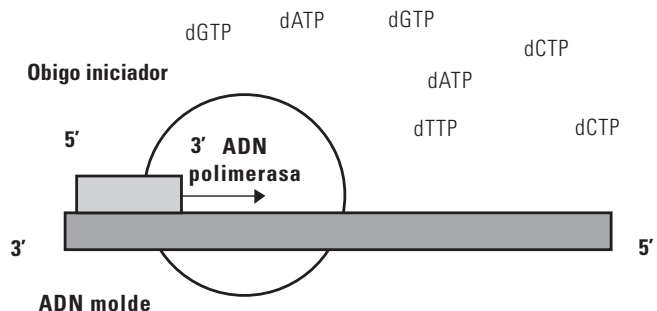


Figura 6. Esquema del proceso de amplificación de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. El proceso se realiza en un termociclador que ajusta cíclicamente las temperaturas de desnaturalización (94°-95 °C), incorporación (>50 °C, en función de la temperatura de fusión de los iniciadores) y extensión (68°-72 °C), que es la temperatura óptima de la *Taq* polimerasa empleada (ver texto).

pasos de cada ciclo (desnaturalización, alineamiento y extensión) son efectuados automáticamente mediante un termociclador, que en modalidad programable puede alterar rápidamente la temperatura y mantener los tubos a la temperatura deseada por un tiempo predeterminado.

Este método ha sido empleado desde principios de los años noventa del siglo pasado, para la detección de todos aquellos virus de los que se tienen fragmentos clonados que permiten diseñar iniciadores específicos (Lightner & Redman, 1998). En particular, el método es de gran utilidad en aquellos casos donde la sensibilidad es determinante (Bonami, 1997), como es el caso de infecciones incipientes, donde sólo unos pocos virus están presentes en los tejidos del camarón infectado. Teóricamente, bastará que una sola molécula de ADN esté presente en la muestra para que ésta sea amplificada, generando una señal visible como una banda en una electroforesis en gel. En la práctica se considera como límite inferior de detección el orden de las docenas de femtomoles (Cowley *et al.*, 2000).

Entre los primeros intentos exitosos de detección y diagnóstico de presencia viral en cultivos camarónicolas están los sistemas desarrollados por Chang *et al.* (1993) para el PmSNPV (Baculovirus tipo-*Penaeus monodon*) y Wang *et al.* (1996) para PvSNPV (virus tipo *Baculovirus penaei*).

Actualmente, debido a los estragos que ha producido el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), se han desarrollado una serie de sistemas de iniciadores para su detección (Lo *et al.*, 1996; Kasornchandra *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Tapay *et al.*, 1999). Estos sistemas, aunque útiles, adolecen del defecto de haber sido diseñados a partir de fragmentos clonados sin conocer con precisión el grado de conservación del gen del que se derivan. De esta manera, los resultados pueden ser variables y crear confusión cuando el virus que se pretende detectar pudiera tener variantes geográficas en su composición genética. Un caso así fue discutido por Kasornchandra *et al.* (*op. cit.*), al aplicar su sistema a muestras provenientes de seis países asiáticos, obteniendo resultados variables en el tamaño de la banda esperada. No obstante, algunos de estos sistemas se han empleado con éxito para la detección de presencia del virus en algunos otros países afectados, como por ejemplo, Filipinas (Magbanua *et al.*, 2000).

El empleo de algunos sistemas de iniciadores para detectar presencia viral puede producir falsos negativos. Las razones de la existencia de resultados confusos pueden ser varias. Entre ellas, destacan las siguientes: 1) la región genómica en la que se basaron los autores que propusieron un sistema de iniciadores para diagnóstico pudo no haber sido una región conservada en el taxón, lo que hace que algunas variantes geográficas del virus no puedan ser identificadas por esos sistemas. Las variantes geográficas de WSSV han sido demostradas por Lo *et al.* (1996) y Wang *et al.* (2000); y 2) los signos patognomónicos pudieran

ser dados por algún tipo de patógeno diferente a WSSV, como lo demostraron Wang *et al.* (*op. cit.*) en cultivos malayos de *P. monodon*, y Goarant *et al.* (2000) en *P. stylirostris* de granjas de Nueva Caledonia, donde un agente de tipo bacteriano produjo síntomas parecidos a los del WSSV.

Este método ha sido empleado también con fines de investigación, p. ej., para la demostración del amplio espectro de infectividad del WSSV. Mediante PCR fue posible detectar que este virus es capaz de infectar, aunque sin la morbilidad que presenta en camarones, a langostinos *Macrobachium rosenbergii* (Peng *et al.*, 1998) y al cangrejo *Uca pugilator* (Kanchanaphum *et al.*, 1998). Además, se ha utilizado como prueba complementaria en la detección de nuevas enfermedades de origen viral en las especies de peneidos comúnmente cultivadas, o en la detección de virus conocidos presentes en especies distintas a aquellas donde éstos se presentan normalmente (Park *et al.*, 1998)

Asimismo, la alta sensibilidad del método permitió detectar la presencia en el mercado estadounidense de WSSV, en camarón congelado procedente de Asia, lo que prueba, de alguna manera, la hipótesis de Lightner *et al.* (1997) acerca del riesgo de dispersión viral por el traslado internacional de camarón vivo y congelado (Durand *et al.*, 2000).

Transcripción reversa asociada a PCR (RT-PCR).

Los virus que contienen una molécula de ARN como genoma también pueden ser detectados mediante PCR, pero es necesario un paso preliminar en el que la molécula de ARN es convertida a su ADNc por medio de una enzima característica de los ARNvirus: la transcriptasa reversa, la cual es empleada por éstos para convertir su genoma de ARN en ADN en la célula hospedera. Esta variante de la técnica es conocida como RT-PCR y fue desarrollada para estudios de expresión génica donde era necesario determinar exactamente los niveles de ARN mensajero (ARNm) (Fig. 7).

Cuando se desea emplear el RT-PCR clásico para la detección de virus, se presentan algunas diferencias en relación con la preparación del ADNc. Primero, no es adecuado emplear iniciadores del tipo oligo-dT, ya que, en contraste con los ARNms eucarióticos, normalmente los virus no poseen una cola de poli-A. Por lo tanto, es más adecuado diseñar iniciadores específicos (generalmente a partir de ADNc clonado con origen en fragmentos de ARN del genoma) que permitan la amplificación selectiva de la región genómica deseada. Segundo, y muy relacionado con lo anterior, se debe partir de ARN altamente purificado, para evitar que al estar presente ADN, éste pudiera servir también como molde en la amplificación (McPherson & Moller, 2000).

Algunos métodos de detección y diagnóstico se han desarrollado con base en la técnica de RT-PCR. Entre ellos, se cuenta con un sistema de iniciadores para la detección de TSV, los cua-

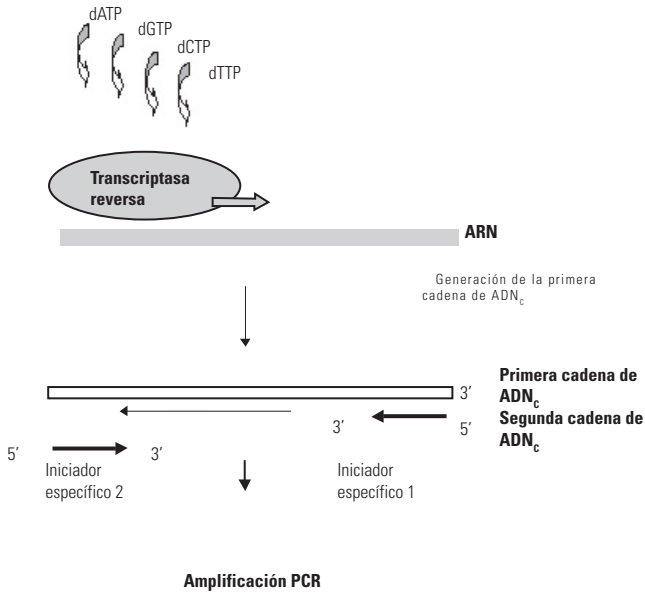


Figura 7. Esquema del proceso en que se basa la RT-PCR. El primer paso implica el uso de la transcriptasa reversa para sintetizar, a partir de la cadena de ARN viral, una cadena de ADNc de donde puede partir la amplificación normal por medio de PCR (ver texto).

les fueron diseñados de ADNc clonado del genoma de ese virus y han sido probados mediante infecciones experimentales de TSV en *P. vannamei* y *P. stylirostris* (Nunan *et al.*, 1998). Cowley *et al.* (2000) publicaron métodos de detección mediante RT-PCR para el virus asociado a las branquias (GAV) y el virus del órgano linfoide (LOV). De la misma forma, se cuenta con dos pares de

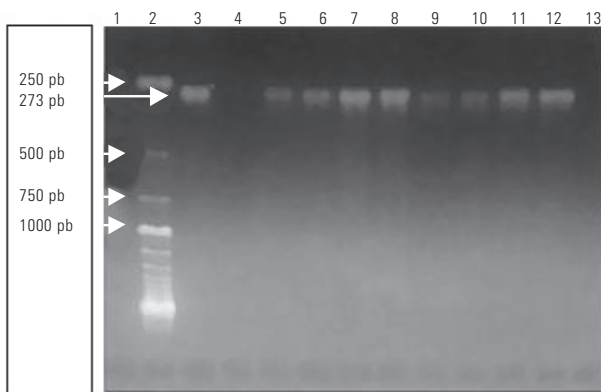


Figura 8. Electroforegrama en gel de agarosa de amplicones producidos por RT-PCR mediante cebadores específicos para YHV. Columna 2: escalera molecular de 250 pb; columna 3: control positivo de camarón infectado experimentalmente con YHV (273 pb); columna 4: control negativo de camarón sano; columnas 5-12: pruebas positivas de camarones en cultivo (273 pb). Secuencia de los iniciadores: YHV273F: 5'CAAGATCTCACGGCAACTCA-3'; YHV273R: CCGACGAGAGTGTTAGGAGG-3' (Tang & Lightner, 1999).

iniciadores para diagnóstico mediante RT-PCR anidado para YHV (Tang & Lightner, 1999), que ha sido empleado con éxito para la detección del virus en producto congelado (Durand *et al.*, 2000) y en vivo (Zambrano-García, 2002) (Fig. 8).

Como se mencionó con anterioridad, el conocimiento de la organización genómica permitirá diseñar iniciadores más precisos para la detección inequívoca de la presencia de virus en especímenes de cultivo. Actualmente se cuenta ya con la caracterización genómica de TSV (Mari *et al.*, 2002).

Al respecto, la técnica de RT-PCR ha resultado una opción de investigación del genoma más sencilla, dada la enorme dificultad para clonar el material genético completo de YHV. Este virus presenta una gran fragilidad, lo cual ha impedido obtener la cantidad mínima necesaria para llevar a cabo su clonación. En cambio, con base en los hallazgos de Cowley *et al.* (1999), en lo que se refiere a las grandes similitudes entre los virus YHV y GAV, y dado que se ha logrado elucidar la secuencia completa de este último, con la aplicación de una estrategia metodológica denominada "iniciador andante" (*primer walking*) (Ansorge *et al.*, 1997), es factible diseñar iniciadores "familiares" (que amplifican el mismo fragmento en el nivel de familia) a partir de la secuencia de GAV y amplificar, mediante RT-PCR, fragmentos del genoma de YHV. Posteriormente, se secuencian los productos de amplificación de aquellos pares de iniciadores exitosos y se rediseñan nuevos pares de iniciadores, con base en la secuencia obtenida de YHV hasta completar la secuencia total.

PCR en tiempo real (qPCR).

Higuchi *et al.* (1992) idearon una forma de hacer de la reacción en cadena de la polimerasa una técnica cuantitativa al agregar un fluorocromo que se intercale o enlace proporcionalmente con la doble cadena del ADN que se sintetiza durante la reacción y detectar el incremento de fluorescencia con algún dispositivo fluorimétrico. Debido a que es posible cuantificar la fluorescencia a lo largo de la PCR, particularmente en la fase exponencial de síntesis, se le llamó PCR en tiempo real.

El método en condiciones estándar puede emplear dos tipos de química, principalmente la sonda de tipo TaqMan, o un fluorocromo, como el SYBR Green. En ambos casos, se diseñan iniciadores altamente específicos (con temperaturas de fusión superiores a los 60° C) para amplificar un fragmento no mayor a 150 pb.

En el caso de la sonda TaqMan, ésta se refiere prácticamente a un tercer iniciador que participa de manera muy específica en la PCR a manera de reportera del número de copias que se producen en cada ciclo de reacción. Para lograr este propósito, la sonda TaqMan está conformada por una secuencia específica de ADN que incorpora un agente fluorescente en el extremo 5', al que se le conoce como reportero, y una molécula no fluorescente en el extremo 3', denominada apagador. Cuando estas dos sustancias se encuentran cercanas en los extremos

de la sonda, la fluorescencia que emite el reportero al ser estimulado por una fuente externa la absorbe el apagador, resultando en una fluorescencia global nula. Cuando la sonda es degradada durante el proceso de la PCR, debido a la acción exonucleasa de la polimerasa, reportero y apagador se separan y la cantidad de fluorescencia relativa se incrementa. Al proceso se le conoce como "transferencia de energía resonante fluorescente" (FRET, por sus siglas en inglés).

El reactivo SYBR Green I es una molécula pequeña que emite fluorescencia cuando se enlaza a el surco menor del ADN. Este compuesto cumple con dos condiciones básicas que le permiten ser usado en los ensayos de qPCR: 1) la fluorescencia detectada es directamente proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de la PCR, y 2) esta molécula no inhibe la PCR ni disminuye su eficiencia de amplificación. Al utilizar este reactivo para la qPCR se debe poner especial cuidado con la especificidad de los iniciadores, ya que si se generan productos inespecíficos, el SYBR Green puede enlazarse a ellos y alterar el resultado cuantitativo.

El qPCR se desarrolla con la misma secuencia que el PCR, es decir, ejecutando ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión, pero a diferencia de éste, donde se analiza el resultado en el punto final, el qPCR no requiere de una electroforesis para conocer el resultado, sino que al final de los ciclos de amplificación se construye una gráfica de la segunda derivada de la función de fluorescencia contra la temperatura, donde queda representada la temperatura de fusión como un pico bien definido a la temperatura detectada por el sistema. Si se detecta más de un pico a una temperatura de fusión menor a la esperada, esto puede indicar la formación de dímeros con los iniciadores o amplificaciones inespecíficas.

El resultado final que arroja el qPCR es una gráfica, donde en el eje horizontal está representado el número de ciclos y en el eje vertical la fluorescencia normalizada con el ciclo anterior (el incremento en la fluorescencia por tanto) y la fluorescencia de la referencia pasiva (control interno del aparato). Esta gráfica representa entonces el incremento en el número de copias del ADN amplificado con respecto a cada ciclo. Al fijar un nivel de fluorescencia dentro de la fase geométrica de amplificación (equivalente al número de moléculas de ADN finales), el número de ciclos que son necesarios para que la fluorescencia alcance este valor fijo será directamente proporcional a la concentración inicial. A este valor se le conoce como CT o umbral de ciclos y en ese número se basan las cuantificaciones mediante qPCR (Servín-Vega, 2004).

El procedimiento con sondas TaqMan hace del qPCR un método mucho más específico y sensible (detecta hasta dos copias del fragmento a amplificar) que el uso del fluorocromo SYBR Green; sin embargo, los resultados obtenidos con este último son lo suficientemente sensibles y específicos para ser usados en la detección y cuantificación de virus en camarones.

Por ejemplo, Dhar *et al.* (2001) desarrollaron una prueba para detectar y cuantificar los virus IHNV y WSSV por qPCR, usando SYBR Green como fluorocromo. Estos autores obtuvieron una relación lineal entre la cantidad de ADN plasmídico empleada para generar la curva estándar y el umbral de ciclos (C_T) en un intervalo de 1 a 10^5 copias del genoma viral. Asimismo, puede amplificarse simultáneamente el gen de la β -actina (gen constitutivo en el camarón), como control interno de la reacción. Mediante la obtención de los valores de C_T de muestras infectadas con IHNV y WSSV, por separado, se pudo calcular el número de copias virales a partir de las curvas C_T de esos virus. Así, los autores estiman que su técnica es de 100 a 2000 veces más sensible que la PCR normal.

Un ejemplo de aplicación del qPCR con sonda TaqMan es la publicada por Tang & Lightner (2001) para IHNV. Tanto los iniciadores, que amplifican un fragmento de 81 pb, como la sonda TaqMan fueron diseñados a partir del ORF1 del genoma de IHNV. El fragmento amplificado fue clonado y el plásmido pIHNV-P4 fue usado como control positivo en sus ensayos. Éstos revelaron un intervalo de detección de entre 10 y 5×10^7 copias de ADN de IHNV. Además de probar su método en muestras de camarón del medio silvestre y cultivado, donde lograron detectar con alta sensibilidad infecciones crónicas del virus, probaron la capacidad de resistencia de una cepa de *P. stylirostris* spr (resistente a enfermedades específicas) ante un reto *per os* con material contaminado con IHNV. Después de 32 días del ensayo no hubo signos de infección, mientras que una población control de *P. vannamei* contenía hasta 10^8 copias de IHNV a los 30 días de infectado.

Cuando se requiere detectar y cuantificar virus con genoma de ARN, es factible efectuar un RT-qPCR. Nunan *et al.* (2004) desarrollaron un ensayo para determinar el número de copias virales en *P. vannamei* infectado experimentalmente con el virus del síndrome de Taura. Un lote de camarones fue infectado tanto mediante inyección como *per os* y se examinaron las cargas virales en diferentes tejidos. En el ensayo con infección por inyección no se encontró diferencia en carga en los tejidos analizados, mientras que cuando el camarón ingirió el material infectado, hubo diferencias estadísticas entre abdomen y branquias, entre abdomen y urópodo y entre pleópodos y urópodo. El abdomen fue el tejido que menos carga viral mostró, así como los pleópodos, comparados ambos contra el urópodo. La media del número de copias virales por nanogramo de ARN total en el experimento con inyección fue de 1.4×10^5 en branquias y 2.3×10^5 en el abdomen completo. En el experimento *per os* el intervalo fue de 2.5×10^4 en el músculo abdominal a 4.3×10^5 en el cefalotórax.

Los ejemplos anteriores dan una idea del amplio potencial que tiene esta nueva técnica para la detección altamente específica y la cuantificación de gran sensibilidad de virus en

camarones. Asimismo, representa una poderosa herramienta para la investigación del proceso de infección viral.

Hibridación molecular en gota inmovilizada (Dot-Blot).

La herramienta diagnóstica empleada en esta técnica es la sonda molecular, la cual puede ser diseñada a partir de secuencias conocidas de fragmentos clonados del genoma viral, o bien, simplemente purificada a partir de amplicones generados por medio de PCR, en la que se utilizaron iniciadores diseñados para la detección del virus.

El método de detección "hibridación molecular en gota inmovilizada (Dot-Blot)", se basa en el principio de hibridación molecular, en el que una sonda marcada (actualmente se emplea en forma común digoxigenina como molécula reportera, como ya se comentó), se une, por medio de puentes de hidrógeno, al fragmento complementario de un genoma viral (ADN o ARN), el cual ha sido inmovilizado sobre una membrana de nylon.

De las muestras de tejido de camarón se extrae, ya sea el ADN o el ARN (dependiendo del virus que se quiera detectar) y se aplica una pequeña muestra de esos extractos en una membrana de nylon cargada positivamente, la cual ha sido previamente cuadrículada para ubicar inequívocamente la posición de cada muestra. El ácido nucleico es entonces fijado a la membrana mediante radiación UV o calor y se trata ésta con una solución bloqueadora para evitar reacciones inespecíficas. A continuación, a una solución de hibridación se le agrega la sonda marcada, y se pone en contacto con la membrana a una temperatura determinada (normalmente 42° C para hibridaciones ARN-ADN, o 68° C para hibridaciones ADN-ADN) y en agitación constante. Tras un tiempo determinado, se detiene la reacción y se efectúan lavados exhaustivos a la membrana. Finalmente, se agrega el anticuerpo contra la marca (anti-DIG), el cual está unido a una enzima que catalizará una reacción ante la presencia de un sustrato, que unido a una sustancia fluorescente o que desarrolle color, indicará la presencia del fragmento del genoma viral en caso de que la muestra contuviera al virus en cuestión (Fig. 9).

Se trata de un método sencillo que es utilizado cada vez más frecuentemente como rutina en la detección de agentes virales dada su rapidez y relación costo:efectividad (Carr *et al.*, 1996). Aunado a lo anterior, la toma de muestra no es destructiva, ya que es factible emplear hemolinfa para el ensayo.

Desde la primera sonda molecular construida con fines diagnósticos para el IHNV a principios de los años noventa del siglo pasado (Mari *et al.*, 1993), se han desarrollado sondas moleculares prácticamente para todos los virus que afectan a los cultivos de camarón. Un ejemplo completo del procedimiento de elaboración de una sonda molecular para la detección de TSV y su uso en diagnóstico por Dot-Blot e hibridación *in situ* puede ser consultado en Mari *et al.* (1998).

Hibridación in situ.

El método de mayor contundencia para la detección y diagnóstico de enfermedades virales que afectan al camarón es la hibridación *in situ*. Este método emplea como herramienta molecular sondas específicas, las cuales se aplican directamente sobre cortes histológicos de camarones que se sospecha puedan haber sido infectados por agentes virales. A diferencia de los análisis histopatológicos tradicionales, donde es necesario desarrollar una amplia experiencia en la identificación de estructuras celulares modificadas por la acción del patógeno, mediante la aplicación de sondas moleculares es fácilmente reconocible la presencia del virus. Además, dada la especificidad de la sonda empleada, se puede diagnosticar sin ambigüedades el tipo de virus que está presente.

La técnica empleada sigue un protocolo semejante a la que se utiliza en el Dot-Blot, con algunas modificaciones que implican, p. ej., la digestión parcial del tejido mediante alguna proteasa (p. ej. proteinasa K), y el uso de algún detergente (p. ej. sarcosina), que lisen tanto las membranas celulares como las cápsides virales, con el objeto de permitir la difusión de la sonda y propiciar la reacción de hibridación molecular.

El tamaño de la sonda es crítico, precisamente porque es necesario que ésta se difunda adecuadamente a través de los tejidos. Por lo tanto, los tamaños más adecuados de sonda

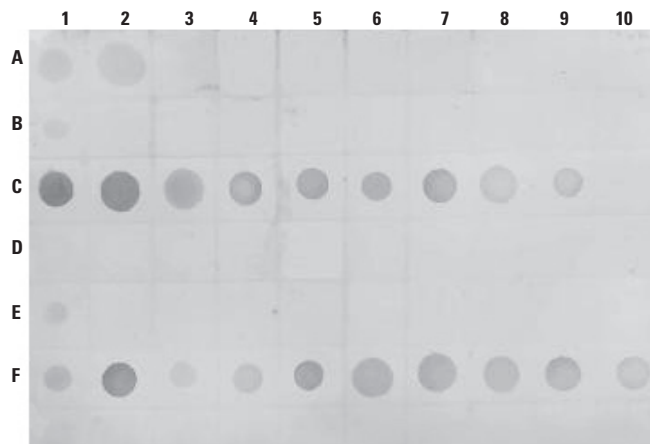


Figura 9. Hibridación Dot-Blot en membrana de nylon de ARN total de pleópodos de camarón. Se muestra un ejemplo de dos muestras registradas como positivas para el virus YHV mediante RT-PCR. A1, A2: control positivo 1 μ L, 2 μ L; A3: control negativo 1 μ L; B1, E1: 1 μ L de ARN extraído de hemolinfa agrupada a partir de las muestras positivas por RT-PCR; C1-10, F1-10: en cada cuadro, 1 μ L of ARN extraído individualmente de pleópodos correspondientes a cada espécimen de las muestras positivas a partir de RT-PCR. Temperatura de hibridación: 42° C. Sonda utilizada: amplicón de 273 pb de un fragmento del gen putativo pol de YHV, marcado con digoxigenina (DIG) (Tang & Lightner, 1999; Méndez-Payán, 2003).

se encuentran en un intervalo entre 200 y 500 pb (el protocolo completo puede ser consultado en Boehringer-Mannheim, 1996 y referencias posteriores). Una vez completo el protocolo, las laminillas tratadas se observan al microscopio, donde se apreciarán cúmulos de color que evidencian la presencia de virus en los tejidos que han sido invadidos por el agente patógeno (Fig. 10).

La hibridación *in situ* ha sido empleada con éxito para el diagnóstico de diversos virus. Por ejemplo: para el *Baculovirus penaei* (Bruce *et al.*, 1993, 1994 b), para IHNV (Mari *et al.*, 1993), para PmSNPV (Poulos *et al.*, 1994), para HPV (Mari *et al.*, 1995), para TSV (Mari *et al.*, 1998), para YHV (Tang & Lightner, 1999) y para WSSV (Chang *et al.*, 1998; Shi, 2000).

Otras aplicaciones en investigación han sido la diferenciación de cepas virales con distinto origen (Durand *et al.*, 1998), el reconocimiento de los órganos blanco en una infección por *Baculovirus penaei* (Bruce *et al.*, 1994 b) y el seguimiento del desarrollo de la enfermedad provocada por TSV (cf. Hasson *et al.*, 1999).

ESTRATEGÍA DE CONTROL SANITARIO

De lo descrito a lo largo del documento, queda establecido que:

1) El problema de las epizootias virales es quizá la amenaza más tangible para el desarrollo de la camaronicultura en el ámbito mundial y la que requiere de una estrategia inmediata para su control.

2) Los métodos tradicionales de detección y diagnóstico, aunque aportan información valiosa para la definición del proble-

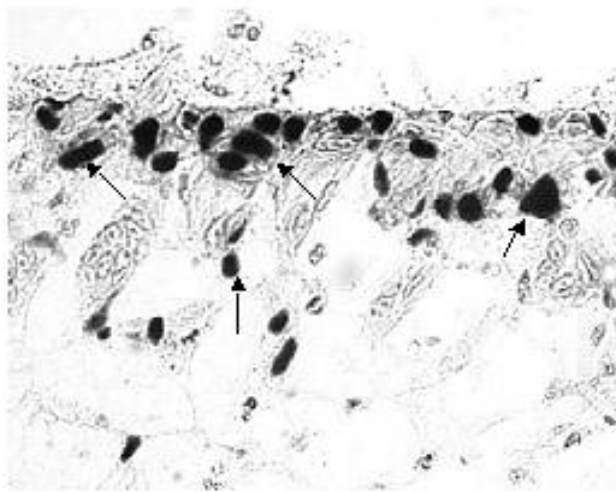


Figura 10. Prueba diagnóstica para WSSV mediante hibridación *in situ* en corte histológico de tejido epitelial de camarón *P. chinensis*. Las flechas indican algunos de los núcleos donde tuvo lugar la hibridación con la sonda preparada a partir de un fragmento de 1.7 kpb clonado del genoma de WSSV (Shi, 2000).

ma, no son los más oportunos, sensibles, específicos ni eficaces para ser incluidos como parte de esa estrategia.

3) Los métodos moleculares ofrecen, en cambio, esas características, y se perfilan como las herramientas más útiles para el establecimiento de un control sanitario.

¿Cómo aprovechar las bondades de estas herramientas para frenar la dispersión de agentes virales a través de los cultivos de camarón a escala mundial?

Primero, queda establecido que una importante fuente de esa dispersión es el traslado indiscriminado y sin control de larvas, poslarvas y reproductores entre laboratorios y granjas o entre granjas en los ámbitos nacionales e internacionales. Segundo, dados los brotes epizooticos repetidos de enfermedades virales en granjas alrededor del mundo, y la acción de drenar al mar los contenidos de los estanques infectados, la posibilidad de infección a poblaciones naturales es obvia y lamentable, principalmente cuando se trata de virus exóticos procedentes de regiones apartadas de la granja afectada. Tercero, el uso de larvas y poslarvas del medio natural para iniciar cultivos en países productores menos desarrollados, donde aún no se ha establecido la infraestructura suficiente en laboratorios de producción de larvas, incrementa el riesgo de brotes virales, convirtiendo la actividad en un círculo vicioso.

Con base en lo anterior, es evidente que un primer paso obligado es la suspensión absoluta de la utilización de larvas del medio natural, por lo menos hasta tener, como segundo paso, una evaluación global de la presencia de virus patógenos en las poblaciones naturales mediante herramientas moleculares. Esto se puede lograr con la colaboración de las flotas camaroneras, que pescan intensiva y extensivamente en las costas donde se desarrollan las poblaciones naturales del camarón.

Como tercer paso, se sugiere que cada traslado de producto camaronero en cualquier presentación, ya sea para cultivo o para consumo, cuente con un certificado sanitario basado en pruebas moleculares, con los iniciadores y/o sondas existentes en la actualidad. Evidentemente, la evolución y aparición de nuevos virus no va a parar, por lo que podrán aparecer nuevas amenazas virales en el futuro; sin embargo, lo que se pretende evitar es seguir esparciendo lo que ya sabemos que existe.

Los análisis de muestras para exportación o simple traslado entre granjas, deberán realizarlo laboratorios fundados para ese propósito, certificados por una comisión técnica calificada y financiados en partes proporcionales por los gobiernos y el sector productivo. La distribución y el número de estos laboratorios deberá corresponder a la densidad de granjas en una región determinada.

La gran sensibilidad de las herramientas moleculares hace posible detectar la presencia de virus en etapas muy incipientes

de la infección, lo que las convierte en instrumentos de malla muy fina para filtrar cualquier posible amenaza de introducción. El tiempo tan corto que se emplea para su aplicación da la oportunidad suficiente para no frenar la dinámica acelerada de esta actividad. Su especificidad permite hacer una evaluación exacta del grado de riesgo que puede significar la presencia de un determinado tipo de virus. Por último, lo evidente de los resultados de las pruebas moleculares permite que, una vez que la prueba ha sido desarrollada y estandarizada, no se requiera de personal altamente especializado para aplicarlas.

La instauración de una estrategia de control sanitario para evitar las epizootias virales en la camaronicultura requiere de la unión de voluntades. Es urgente una norma internacional que regule el desplazamiento de productos para cultivo o consumo, basada en la ética más elemental y en las herramientas moleculares.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los tres árbitros anónimos cuyos comentarios y sugerencias mejoraron sustancialmente este trabajo. Este trabajo fue patrocinado por el CONACyT mediante el proyecto 26657-B. La movilidad de los autores para la discusión y puesta a punto de las ideas se dio gracias al apoyo del PCP # 02/00.

REFERENCIAS

- BAUMANN, J.G.J., J. WIEGANT & P. VAN DUJIN. 1981. Cytochemical hybridization with fluorochrome labeled RNA. III. Increased sensitivity by the use of fluorescein antibodies. *Histochemistry*. 73: 181-193.
- BAUMANN, J.G.J., M. VAN DER PLOEG & P. VAN DUJIN. 1984. Fluorescent hybridocytochemical procedures: DNA-RNA hybridization *in situ*. In: Chayen, J. & L. Bitensky. (Eds.). *Investigative Microtechniques in Medicine and Microbiology*. Marcel Dekker. New York, pp. 41-48.
- BILIO, M., A.S. COZE & A. HERNÁNDEZ-PORTOCARRERO. 1999. Mangroves, shrimps and the development of coastal areas in Central America. *EC Fisheries Bulletin*. 12 (4): 20-22.
- BOEHRINGER-MANNHEIM. 1996. *Nonradiative In situ Hybridization. Application Manual*. Second Edition. Boehringer-Mannheim GmbH, Biochemica. Germany. 214 pp.
- BONAMI, J.R. 1997. The crustacean virus diseases: recent developments. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 17 (6): 1-3.
- BONAMI, J.R., B. TRUMPER, J. MARI, M. BREHELIN & D.V. LIGHTNER. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal of General Virology*. 71: 2657-2664.
- BONAMI, J.R., J. MARI, B.T. POULOS & D.V. LIGHTNER. 1995. Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. *Journal of General Virology*. 76: 813-817.
- BONAMI, J.R., K.W. HASSON, J. MARI, B.T. POULS & D.V. LIGHTNER. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *Journal of General Virology*. 78: 313-319.
- BOONYARATPALIN, S., K. SUPAMATTAYA, J. KASORNCHANDRA, S. DIREKBUSARACOM, U. AEKPANITHANPONG & C. CHANTANACOOKLIN. 1993. Non-Occluded Baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *Gyobyo Kenkyu* 28 (3): 103-109.
- BRIGGS, M., S. FUNGE-SMITH, R. SUBASINGHE & M. PHILLIPS. 2004. Introduction and movement of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* in Asia and the Pacific. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok, Thailand. 92 pp.
- BRUCE, L.D., R.M. REDMAN, D.V. LIGHTNER & J.-R. BONAMI. 1993. Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*. 17: 215-221.
- BRUCE, L.D., R.M. REDMAN & D.V. LIGHTNER. 1994 A. Application of gene probes to determine target organs of a penaeid shrimp baculovirus using *in situ* hybridization. *Aquaculture*. 120: 45-51.
- BRUCE, L.D., D.V. LIGHTNER, R.M. REDMAN & K.C. STUCK. 1994 B. Comparison of traditional and molecular detection methods for *Baculovirus penaei* infections in larval *Penaeus vannamei*. *Journal of Aquatic Animals Health* 6: 355-359.
- CARR, W.H., J.N. SWEENEY, L. NUNAN, D.V. LIGHTNER, H. H. HIRSH & J.J. REDDINGTON. 1996. The use of an infectious hypodermal hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*. 147: 1-8.
- CHANG, P.S., H.C. CHEN & Y.C. WANG. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture*. 164: 233-242.
- CHANG, P.S., C.F. LO, G.H. KOU, C.C. LU & S.N. CHEN. 1993. Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type Baculovirus (MBV). *Journal of Invertebrates. Pathology*. 62: 116-120.
- CORNETT, J.H., J. SAWYER & D. SHANAHAN. 1999. Membrane Hybridization. In: Saunders, G.C. & Parkes, H.C. (Eds.). *Analytical Molecular Biology. Quality and Validation*. Chapter 9. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK, pp. 135-154.
- COUCH, J.A. 1974. Free and occluded virus, similar to Baculovirus, in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature* 247: 229-231.
- COWLEY, J.A., C.M. DIMMOCK, C. WONTEERASUPAYA, V. BOONSAENG, S. PANYIM & P.J. WALKER. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. *Diseases of Aquatic Organisms*. 36: 153-157.

- COWLEY J. A., C. M. DIMMOCK, K. M. SPANN & P. J. WALKER. 2000. Detection of Australian gill-associated virus (GAV) and lymphoid organ virus (LOV) of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*. 36: 159-167.
- DAHR, A.K., M.M. ROUX & K.R. KLIMPEL. 2001. Detection and quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and White Spot Virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR Green chemistry. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 2835-2845.
- DURAND, S., D.V. LIGHTNER & J.R. BONAMI. 1998. Differentiation of BP-type baculovirus strains using *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*. 32: 237-239.
- DURAND, S.V., K.F. TANG & D.V. LIGHTNER. 2000. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *Journal of Aquatic Animal Health*. 12: 128-135.
- FUCHS, J., J.-L. M. MARTIN & N.T. AN. 1999. Impact of tropical shrimp aquaculture on the environment in Asia and the Pacific. *EC Fisheries Bulletin*. 12 (4): 9-13.
- GOARANT, C., R. BRIZARD & A.L. MARTEAU. 2000. A white spot disease-like syndrome in the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) as a form of bacterial shell disease. *Aquaculture* 183: 25-30.
- HASSON, K.W., D.V. LIGHTNER, L.L. MOHNEY, R.M. REDMAN, B.T. POULOS & B.M. WHITE. 1999. Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 36: 81-93.
- HIGUCHI, R., G. DOLLINGER, P.S. WALSH & R. GRIFFITH. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 10: 413-417.
- HOWE, C. 1995. *Gene Cloning and Manipulation*. Cambridge University Press. Cambridge. 210 pp.
- JOHN, H., M. BIRNSTIEL & K. JONES. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*. 223: 582-587.
- KANCHANAPHUM, P., C. WONGTEERASUPAYA, N. SITIDILOKRATANA, V. BOONSAENG, S. PANYIM, A. TASSANAKAJON, B. WITAYACHUMNARNKUL & T.W. FLEGEL. 1998. Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34: 1-7.
- KASORNCHANDRA, J., S. BOONYARATPALIN & T. ITAMI. 1998. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164: 243-251.
- KESSING, B., H. CROOM, M. MARTIN, C. MCINTOSH, W.O. McMILLAN & S. PALUMBI. 1989. *The Simple Fool's Guide to PCR*. Department of Zoology. University of Hawaii. 217 p.
- KIM, C.K., P.K. KIM, S.G. SOHN, D.S. SIM, M.A. PARK, M.S. HEO, T.H. LEE, J.D. LEE, H.K. JUN & K.L. JANG. 1998. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp. *Journal of Fish Diseases* 21: 11-17.
- LANSDORP, P.M., T.H. VAN DER KWAST, M. DE BOER & W.P. ZEIJLEMAKER. 1984. Stepwise amplified immunoperoxidase (PAP) staining. I. Cellular morphology in relation to membrane markers. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 32: 172-178.
- LIGHTNER, D.V. 1993. Diseases of penaeid shrimp. In: McVey, J.P. (Ed.) *CRC Handbook of Mariculture*, 2nd edition, Volume 1. Crustacean Aquaculture. CRC Press. Boca Raton, pp. 393-486.
- LIGHTNER, D.V. 1996 a. *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. 244 pp.
- LIGHTNER, D.V. 1996 b. Epizootiology, distribution and the impact of international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Review of science and technology of the Office of international Epizootics* 15(2): 579-601.
- LIGHTNER, D.V. & R.M. REDMAN. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201-220.
- LIGHTNER, D.V., R.M. REDMAN, K.W. HASSON & C.R. PANTOJA. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: histopathology and ultrastructure. *Diseases of Aquatic Organisms* 21: 53-59.
- LIGHTNER D. V., R.M. READMAN, B.T. POULOS, L.M. NUNAN, J.L. MARI & K.W. HASSON. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Review of science and technology of the Office of international Epizootics*. 16 (1): 146-160.
- LO, C.F., J.H. LEU, C.H. HO, C.H. CHEN, S.E. PENG, Y.T. CHEN, C.M. CHOU, P.H. YEH, C.J. HUANG, H.Y. CHOU & C.H. KOU. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25: 133-141.
- LU, Y., L.M. TAPAY, J.A. BROCK & P.C. LOH. 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.
- LU, Y., L.M. TAPAY, P.C. LOH, J.A. BROCK & R. GOSE. 1995. Development of a quantal assay in primary shrimp cell culture for yellow head baculovirus (YBP) of penaeid shrimp. *Journal of Virological Methods*. 52: 231-236.
- MAGBANUA, F.O., K.T. NATIVIDAD, V.P. MIGO, C.G. ALFAFARA, F.O. DE LA PEÑA, R.O. MIRANDA, J.D. ALBALADEJO, E.C.B. JR. NADADLA, P.C. LOH & L. MAHILUM-TAPAY. 2000. White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms*. 42: 77-82.
- MARI, J., J.-R. BONAMI & D.V. LIGHTNER. 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis

- virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimp; diagnosis of the disease using a specific probe. *Journal of General Virology*. 74: 2637-2643.
- MARI, J., D.V. LIGHTNER, B.T. POULOS & J.-R. BONAMI. 1995. Partial cloning of the genome of an unusual shrimp parvovirus (HPV): use of gene probes in disease diagnosis. *Diseases of Aquatic Organisms*. 22: 129-134.
- MARI, J., J.-R. BONAMI & D.V. LIGHTNER. 1998. Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 33: 11-17.
- MARI, J., B.T. POULOS, D.V. LIGHTNER & J.-R. BONAMI. 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.
- MCDOWELL, D. 1999. PCR: factors affecting reliability and validity. In: Saunders, G.C. and H.C. Parkes (Eds.) *Analytical Molecular Biology. Quality and Validation*. Chapter 5. LGC. Teddington. pp 58-80.
- MCPHERSON, M.J. & S.G. MOLLER. 2000. *PCR*. Springer. Oxford. 276 pp.
- MÉNDEZ-PAYÁN, J.C. 2003. Presencia y prevalencia de algunos agentes virales en granjas camaronícolas de Nayarit y Sinaloa evaluadas mediante técnicas de Biología Molecular. Tesis de Maestría. DICTUS, UNISON. 57 pp.
- MOHAN, C.V., K.M., SHANKAR, S. KULKARNI & P.M. SUDHA. 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.
- NAUEN, C.E. 1999. Editorial. *EC Fisheries Bulletin*. 12 (4): 2.
- NEW, B.M. 1997. Aquaculture and capture fisheries: balancing the scales. *World Aquaculture* 28 (2): 11-30.
- NUNAN, L.M., B.T. POULOS & D.V. LIGHTNER. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34: 87-91.
- NUNAN, L.M., K. TANG-NELSON & D.V. LIGHTNER. 2004. Real-time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experimentally infected with Taura syndrome virus. *Aquaculture*. 229: 1-10.
- OCEAN GARDEN. 2001. Boletín Informativo. Marzo. Banco de México, FIRA, Dirección General Adjunta de Fomento Tecnológico. Subdirección de Cadenas Productivas. Culiacán, Sinaloa. 6 pp.
- PARDUE, M.L. & J.G. GALL. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 64: 600-604.
- PARK, J.H., Y.S. LEE, S. LEE & Y. LEE. 1998. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34: 71-75.
- PENG, S.E., C.F. LO, C.H. HO, C.F. CHANG & G.H. KOU. 1998. Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Machrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. *Aquaculture*. 164: 253-262.
- PÉREZ-FARFANTE, I. & B. KENSLEY. 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World (Keys and Diagnoses for the Families and Genera). Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle. Tome 175. Éditions du Muséum. Paris. 233 pp.
- PINKEL, D., T. STRAUME & J.W. GRAY. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 83: 2934-2938.
- POULOS, B.T., J. MARI, J.-R. BONAMI, R. REDMAN & D.V. LIGHTNER. 1994. Use of non-radioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization on fixed tissue. *Journal of Virological Methods*. 49: 187-194.
- RENZ, M. & C. KURZ. 1984. A colorimetric method for DNA hybridization. *Nucleic Acid Research*. 12: 3435-3444.
- ROSENBERRY, B. (Ed.). 1999. *World Shrimp Farming*. Shrimp Farming International. San Diego, California. 320 pp.
- ROSENBERRY, B. (Ed.). 2001. *World Shrimp Farming*. Shrimp Farming International. San Diego, California. 316 pp.
- SABATINI, P. & G. O'SULLIVAN. 2004. Shrimp commodity update. FAO/Globefish. Roma, Italia. 83 pp.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS. 2001. *Molecular cloning. A laboratory Manual*. Third Edition. Three volumes. Cold Spring Harbor. New York.
- SANO, T. 1998. A novel tissue organized in the primary hemolymph culture of *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*. 164: 289-296.
- SERVÍN-VEGA, L.E. 2004. Manual de entrenamiento para usuarios. Sistema de PCR en tiempo real ABI Prism 7000 SDS. *Applied Biosystems*. 29 pp.
- SHI, Z. 2000. Etude d'un virus bacilliforme des crevettes Penaidae ("White Spot Syndrome Virus", WSSV): clonage, analyse partiel du génome et outils de diagnostic. Thèse Doctoral. Academie de Montpellier. Université Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc. 205 pp.
- TANG, K. F. J. & D.V. LIGHTNER. 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*. 35: 165-173.
- TANG, K. F. J. & D.V. LIGHTNER. 2001. Detection and quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*. 44: 79-85.
- TAPAY, L.M., E.C.B. JR. NADALA & P.C. LOH. 1999. A polymerase chain reaction (PCR) protocol for the detection of various geographical

- isolates of White Spot Virus (WSV). *Journal of Virological Methods*. 82: 39-43.
- TAYLOR, G.R. 1993. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: McPherson, M.J., P. Quirke & G.R. Taylor. (Eds.). *PCR. A Practical Approach*. Chapter 1. IRL Press. Oxford, pp. 1-14.
- TOULLEC, J.Y., Y. CROZAT, J. PATROIS, & P. PORCHERON. 1996. Development of primary cell cultures from the penaeid shrimps *Penaeus vannamei* and *P. indicus*. *Journal of Crustacean Biology*. 16 (4): 643-649.
- WANG, S.Y., C. HONG & J.M. LOTZ. 1996. The development of a PCR procedure for the detection of *Baculovirus penaei* in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25: 123-131.
- WANG, Y.C., C.F. LO, P.S. CHANG & G.H. KOU. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus and some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164: 221-231.
- WANG, Y.G., K.L. LEE, M. NAJIAH, M. SHARIFF & M.D. HASSAN. 2000. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 41: 9-18.
- WATSON, J.D. 1978. *Biología molecular del Gen*. Tercera Edición. Fondo Educativo Interamericano. México. 739 pp.
- ZAMBRANO GARCÍA, J. 2002. Estandarización de técnicas moleculares para evaluar la presencia del virus cabeza amarilla (YHV) en granjas camaroneras. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Marinas, UABC. 67 pp.

Recibido: 24 de agosto de 2005.

Aceptado: 10 de abril de 2006.

