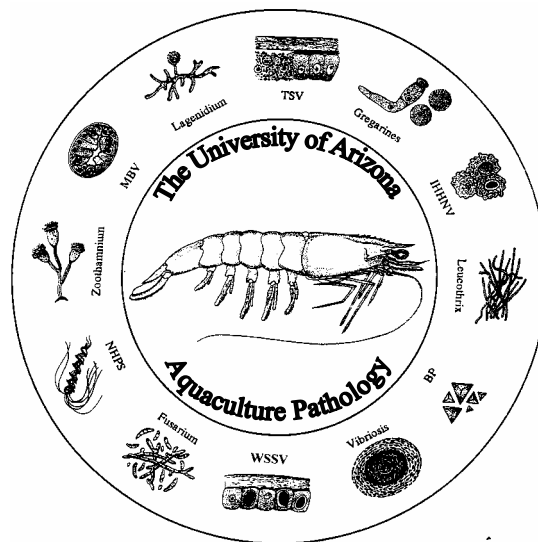




Programa de Reconstrucción Huracán Mitch



MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DEL CAMARÓN

Editado por: Donald V. Lightner, Ph.D. y Carlos R. Pantoja, Ph.D.
Traducido al español por: Carlos R. Pantoja, Ph.D.

CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
1 Introducción	3
2 Métodos	6
3 Enfermedades de origen viral.	
3.1 IHHNV	32
3.2 HPV	42
3.3 WSSV	48
3.4 TSV	58
3.5 YHV	67
4 Enfermedades de origen bacteriano.	
4.1 Vibriosis	73
4.2 NHP	81
5 Citas bibliográficas	88

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Propósito de este manual

El principal objetivo de este manual es proveer a los especialistas en diagnóstico, patólogos e investigadores de Centroamérica, con información actualizada sobre los métodos más apropiados para el diagnóstico de enfermedades de camarones peneidos en esta región.

1.2 Tipos de enfermedades infecciosas.

Los camarones peneidos son propensos a enfermedades causadas por representantes de casi todos los grupos de agentes infecciosos conocidos. Algunos ejemplos son:

- Virus
- Rickettsias y posiblemente clamidias
- Bacterias Gram negativas y positivas
- Hongos
- Protozoarios

1.3 Procedimientos de diagnóstico para la detección de agentes patógenos específicos (Fig.1).

1.3.1 Métodos clásicos.

- Historial.
- Apariencia externa y síntomas clínicos.
- Examen directo al microscopio.
- Microbiología (aislamiento y cultivo).
- Histología y bioquímica.
- Microscopía electrónica.
- Pruebas serológicas con suero inmune.

1.3.2 Métodos moleculares.

- Pruebas serológicas con anticuerpos monoclonales
 - Anticuerpos fluorescentes (AF)
 - ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- Sondas genéticas (con agente localizador radioactivo o no-radioactivo).
 - Hibridaciones tipo “dot blot”.
 - Hibridaciones tipo *in situ* (en cortes histológicos).

1.4 Muestreo.

1.4.1 Muestreo aleatorio.

Cuando se requiera muestrear al azar a una población para determinar el estado de salud o la

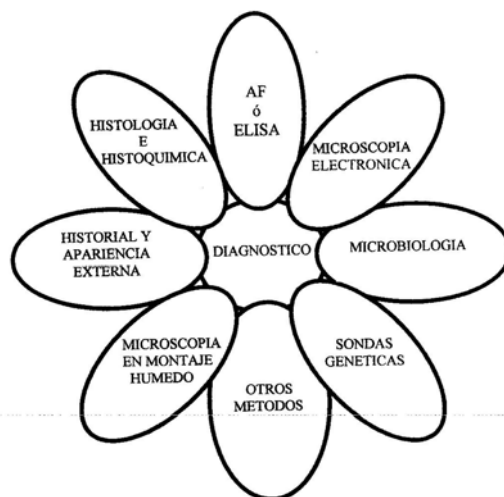


Figura 1. Diagrama esquemático que ilustra los métodos y las fuentes de información que llevan a la formulación de un diagnóstico.

prevalencia de algún patógeno, el número de camarones que será necesario coleccionar va a depender de la prevalencia estimada de dicho patógeno y del nivel estadístico de confianza deseado. En este aspecto, la Tabla 1 puede ser usada como una guía para determinar el tamaño muestral.

1.4.2 Muestreo no aleatorio

En situaciones en las que los camarones exhiben claramente síntomas externos de la enfermedad, el cálculo de la prevalencia es más fácil y la información provista en la Tabla 1 puede ser usada para verificar el tamaño muestral y el nivel estadístico de confianza.

Seleccione por lo menos 10 camarones que muestren síntomas característicos de la enfermedad de la que se sospecha o bien alguna otra anomalía.

Para asegurar un diagnóstico acertado, las muestras deben de ser procesadas de inmediato, o a la brevedad posible, de acuerdo al procedimiento o procedimientos que se hayan seleccionado. Los especímenes deberán ser preservados con la solución fijadora adecuada o bien empacados en hielo o congelados dentro de un contenedor estéril (por ejemplo, bolsas de plástico).

1.5 Grados de severidad

Una forma de documentar de manera semi-cuantitativa las observaciones que servirán para alcanzar un diagnóstico, es a través de la asignación de grados de severidad. Dicha asignación puede referirse a una lesión en particular o al proceso infeccioso en general. La Tabla 2 ilustra

el criterio que se utiliza para la asignación de los grados de severidad. El valor numérico asignado también es útil para determinar tendencias y para la toma de decisiones de manejo tales como: cuando aplicar un tratamiento, cuando cosechar, etc.

Tabla 1. Tamaño muestral basado en una estimación de la prevalencia de un patógeno en una población de camarón (modificado a partir de Amos 1985).

Tamaño de la población	Tamaño muestral requerido a una prevalencia estimada de:						
	2%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
50	50	35	20	10	7	5	2
100	75	45	23	11	9	7	6
250	110	50	25	10	9	8	7
500	130	55	26	10	9	8	7
1,000	140	55	27	10	9	9	8
1,500	140	55	27	10	9	9	8
2,000	145	60	27	10	9	9	8
4,000	145	60	27	10	9	9	8
10,000	145	60	27	10	9	9	8
>/=100,000	150	60	30	10	9	9	8

Tabla 2. Esquema generalizado para la asignación de un valor numérico cualitativo a los grados de severidad de infecciones, infestaciones y síndromes.

Grado de severidad	Observaciones clínicas o histológicas
0	No se observan signos de infección por el agente patógeno, parásito o epicomensal.
	No se observan lesiones características del síndrome.
1	El patógeno, parásito o epicomensal se encuentra presente pero en números o cantidades que apenas sobrepasan los límites mínimos de detección.
	Se observan lesiones características del síndrome pero la manifestación de la “enfermedad” es insignificante.
	La prognosis es de efecto insignificante, excepto en casos tempranos de infección por un patógeno altamente virulento.
2	El patógeno, parásito o epicomensal se encuentra en cantidades pequeñas o moderadas.
	Se observan lesiones ligeras o moderadas, características del síndrome.
	La prognosis es de posibles pérdidas en la producción o incrementos ligeros en la mortandad si no se aplica ningún tratamiento (en el caso de que la enfermedad sea tratable).
3	Se observan cantidades moderadas del patógeno, parásito o epicomensal.
	Se observan lesiones moderadas a severas, características del síndrome.
	La prognosis es de un efecto potencialmente letal si no se aplica ningún tratamiento (en el caso de que la enfermedad sea tratable).
4	Se observan grandes cantidades del patógeno, parásito o epicomensal.
	Se observan lesiones severas, características del síndrome. Prognosis letal.

2 MÉTODOS

2.1 Métodos de campo. Procedimientos de campo para determinar el estado general de salud y para diagnosticar enfermedades infecciosas, parasíticas y no infecciosas de camarones peneidos.

2.1.1 Información general

2.1.1.1 Microscopía de campo

Generalmente el análisis de muestras en el campo se lleva a cabo por medio del examen de especímenes en fresco, para lo cual se requiere de un microscopio compuesto (con o sin contraste de fases).

Si el microscopio no cuenta con contraste de fases, la intensidad de la iluminación se puede controlar incrementando o disminuyendo la distancia entre el condensador y la muestra y abriendo o cerrando el iris del diafragma.

2.1.1.2 Equipo requerido

1. Microscopio compuesto con objetivos de 10, 20 y 40X.
2. Microscopio de disección.
3. Portaobjetos de vidrio y cubreobjetos de grosor #1.
4. Agua de mar esterilizada.
5. Pipetas de vidrio y succionadores para las mismas.
6. Estuche de disección que incluya especialmente tijeras de tipo iris y pinzas de punta fina.
7. Jeringas de plástico de 1ml y 5 ml de capacidad y agujas del #27 y #21.
8. Asa de platino.
9. Mechero de alcohol o mechero Bunsen para esterilizar el asa de platino.
10. Agar Marino; agar TCBS; agar tríptico de soya suplementado al 2% con NaCl.
11. Soluciones fijadoras: Solución de Davidson (AFA) y formalina al 10% amortiguada.
12. Etiquetas resistentes al agua y formas para recabar datos.
13. Contenedores para las muestras.
14. Lápiz
15. Manuales y otras referencias.

2.1.2 Procedimientos para larvas y postlarvas

2.1.2.1 Muestreo

Como ya se mencionó anteriormente, existen básicamente dos tipos de muestreo.

- Muestreo aleatorio. Para efectuar un examen rutinario de salud.
- Muestreo no aleatorio. Cuando se sospecha de una enfermedad y el camarón manifiesta algún tipo de anomalía. Puede ser usado para alcanzar un diagnóstico confirmatorio.

2.1.2.2 Examen externo

- Las muestras deben ser examinadas con la ayuda de un microscopio de disección, colocando los especímenes en una caja Petri o algún otro recipiente similar.
 - Evalúe a los especímenes en base al nivel de actividad, grado de llenado del intestino, presencia de heces fecales, presencia de epicomensales en la cutícula del cuerpo y apéndices, deformidades, apéndices faltantes, rotos, melanizados, etc.
- Seleccione varios animales que presenten alguna anomalía y con la ayuda de una pipeta transfíralos a un portaobjetos (normal o cóncavo). Agregue una gota de agua de mar limpia y coloque encima un cubreobjetos.
- Examine a los animales usando primero los objetivos de menor aumento (por ejemplo, 10X, 20X). Ajustando la cantidad de luz con el condensador del microscopio, busque evidencia de lo siguiente:
 - Presencia de epicomensales (por ejemplo, protozoarios, bacterias filamentosas, etc.) en la cutícula del cuerpo y/o apéndices.
 - Placa bacteriana en la región oral (diagnóstico presuntivo de infección por *Vibrio* spp.).
 - Indicios de micosis larvaria. Por ejemplo: hifas, tubos de descarga y zoosporas móviles.
 - Atrofia muscular del abdomen, especialmente en el sexto segmento, en donde el músculo debe ocupar por lo menos la mitad del espacio disponible.
 - Atrofia del hepatopancreas, niveles de vacuolización, gotas de lípidos y cuerpos de oclusión de *Baculovirus penaei*.

- Desprendimiento de células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas o de la mucosa intestinal. Fenómeno comúnmente conocido como "bolitas blancas". Sirve también como indicador para el diagnóstico presuntivo de vibriosis.
- Acumulación de una sustancia, generalmente de color verde oscuro o negro, dentro de vacuolas citoplasmáticas en los hepatocitos. Fenómeno también conocido como "bolitas negras". Se cree que es debido a la digestión incompleta de cierto tipo de algas y por lo tanto sugiere la presencia de algas de calidad inadecuada en el tanque de cultivo o posiblemente vibriosis.
- Trofozoitos de gregarínidos dentro del estómago, hepatopáncreas o intestino.
- Deformaciones de la cutícula; setas y/o espinas rotas o dobladas, etc.
- Focos de melanización en los apéndices u otras partes del cuerpo.
- Bacilos móviles dentro del hemocele. Indicador de vibriosis en la mayoría de los casos.

2.1.2.2.1 Procedimientos para cuando se sospecha de la presencia de BP o de MBV.

Extraiga el hepatopáncreas con la ayuda de agujas de disección de punto fino (Usted puede fabricar sus propias agujas de disección atando alfileres para entomología del #1 a un soporte de plástico o de madera). El uso de un microscopio de disección puede facilitar la operación. Una vez extraído:

- Coloque el hepatopáncreas sobre una gota de agua de mar limpia en un portaobjetos de vidrio.
- Agregue una gota de colorante verde malaquita al 0.01%.
- Coloque un cubre-objetos encima de la preparación y examine bajo el micros-

copio compuesto usando los objetivos de 20X y/o 40X. Busque cuerpos de oclusión de BP. Los cuerpos de oclusión de BP absorben el colorante verde malaquita pero lo hacen con mucho mayor rapidez que otros objetos, tales como gotas de aceite o células normales. Debido a esto, las preparaciones con verde malaquita deben ser examinadas de inmediato y por períodos de tiempo de no más de 5 minutos.

2.1.2.2.2 Procedimientos para cuando se sospeche la presencia de enfermedades de tipo bacteriano

Se requiere cultivar el agente bacteriano sospechoso utilizando ya sea agar marino y/o agar TCBS. El presente manual no cubre los métodos microbiológicos para el aislamiento y la identificación de bacterias. Sin embargo, en el apéndice de la página 31 se describen los procedimientos para la preparación de muestras y su envío al laboratorio que efectuará el cultivo y aislamiento.

2.1.2.2.3 Procedimientos para la preparación de muestras cuando se requiere análisis histológico

En casos en los que el análisis de muestras en húmedo no sea suficiente para efectuar el diagnóstico de una enfermedad, como por ejemplo IHNV, HPV, TSV u otros agentes causantes de enfermedades o síndromes, o cuando se requiere de una confirmación, se recurre entonces al análisis histológico. En estos casos es necesario preservar las muestras en la solución fijadora más apropiada. Algunos ejemplos de soluciones fijadoras son los siguientes:

- Solución de Davidson (AFA; Alcohol-Formaldehído-Acido acético). Se utiliza en la preparación de muestras para la mayoría de los procedimientos histológicos.
- Formalina al 10% neutralizada. También es útil en la mayoría de los procedimientos histológicos.
- Glutraldehído al 4 o 6% en solución amortiguadora. Necesario para llevar a

cabo un examen por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM=Transmission Electron Microscopy).

2.1.3 Procedimientos para el análisis de juveniles y subadultos

2.1.3.1 Tipos de Muestreo

- Aleatorio. Útil en la vigilancia rutinaria del estado de salud. Los especímenes son muestreados completamente al azar.
- No aleatorio. Útil cuando se sospecha de alguna enfermedad. Sólo se deben de capturar especímenes que muestren algún síntoma físico o comportamiento anormal.

2.1.3.2 Examen de aproximación

- Examine primero la superficie del cuerpo del camarón (cutícula) y busque evidencia de lo siguiente:
 - Deformidades. Por ejemplo, desviamiento del rostrum, arrugamiento de las antenas, etc.
 - Irregularidades. Por ejemplo, cutícula muy delgada, apariencia rugosa, ampollas o vesículas, etc.
 - Melanización. Focos de melanización en el cuerpo o apéndices.
- Cámara branquial:

Cambios en la coloración de los filamentos branquiales. Por ejemplo, la presencia de organismos epicomensales (protozoarios, bacterias filamentosas, algas, etc.), detritus orgánicos, melanización, etc. puede impartir a las branquias una coloración café. La presencia de áreas blanquecinas bien definidas puede ser debida a burbujas de gas (generalmente oxígeno) atrapado dentro de los filamentos branquiales.
- Tracto digestivo:

Separe la cabeza del abdomen. Extraiga el hepatopáncreas y una porción del intestino anterior y coloque cada uno sobre un portaobjetos de vidrio limpio. Observe si el tamaño del hepatopáncreas es normal o si se encuentra atrofiado.

○ Con una navaja o bisturí corte el hepatopáncreas por la mitad y observe el color y la textura:

- a. Normalmente el hepatopáncreas presenta una coloración anaranjada o rojiza.
- b. Una coloración clara acompañada de fluido abundante generalmente indica atrofia severa.
- c. La presencia de vetas de color café oscuro o negro puede indicar hepatopancreatitis necrotizante (NHP; ocasionada por una bacteria intracelular de tipo rickettsia), hepatopancreatitis séptica (SHPNS probablemente debida a infección bacteriana por *Vibrio* sp.) o aflatoxicosis.

Examine el estómago y el intestino y determine si tienen algún contenido.

- Color y textura del músculo y gonadas:
 - Determine la presencia de microsporidiosis (también conocido como “camarón de leche” o camarón de algodón”).
 - Determine si el camarón presenta el síndrome del músculo acalambado (CMS; “Cramped Muscle Syndrome”; flexión del abdomen que no puede regresar a su posición normal). Se sospecha que este síndrome puede ser causado por algún tipo de desorden nutricional o cambios ambientales drásticos (salinidad, temperatura, etc.). En casos severos las mortandades pueden ser bastante altas.

2.1.3.3 Examen directo al microscopio

2.1.3.3.1 Examen de branquias y apéndices

1. Con unas pinzas de disección desprenda uno de los arcos branquiales y una de las mastigobranquias (apéndices con forma de orquilla localizados entre los arcos branquiales) y colóquelos sobre una gota de agua de mar limpia en un portaobjetos de vidrio; desprenda también uno de los palpos labiales y colóquelos junto a las branquias.

2. Cubra la preparación con un cubre-objetos y examine en el microscopio usando baja intensidad de luz y comenzando con los objetivos de menor aumento.
 3. Ejemplos de parásitos, comensales y bio-adherencias que pueden encontrarse durante este examen son:
 - o Algas filamentosas (por ejemplo: *Leucothrix mucor*, *Flexibacter* spp.) y algas verde-azules filamentosas.
 - o Protozoarios: *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Acineta* sp., *Bodo* sp., etc.
 - o Diatomeas.
 - o Melanización de las lamelas branquiales o de las mastigobranquias debido a una variedad de agentes causantes de inflamación y/o necrosis (generalmente se requiere de histología para determinar la causa).
 - o Detritus del fondo de los estanques, restos sedimentados de florecimientos de microalgas en la columna de agua, etc.
- escala de grados del 0 al 4. Si se observa muy poco o nada de lípidos, esto indica una salud pobre y posiblemente alguna enfermedad.
- o Túbulos melanizados.
 - o Cantidades anormalmente altas de bacilos móviles.
 - o Trofozoitos de gregarinidos.
 - o Cuerpos de oclusión de baculovirus.
7. Si se sospecha de la presencia de BP, puede hacer otra preparación agregando una gota de verde malaquita al 0.01% antes de colocar encima el cubre-objetos. Examine la preparación con el microscopio durante los próximos 5 minutos buscando cuerpos de oclusión de baculovirus y núcleos hipertrofiados de hepatocitos. Recuerde que después de un tiempo la mayoría de los objetos en la preparación (por ejemplo núcleos normales, gotas de aceite, etc.) absorberán también el colorante, pero los cuerpos de oclusión de BP lo harán con mucha mayor rapidez. Debido a esto, no extienda el tiempo de observación por más de 5 minutos.

2.1.3.3.2 Examen del hepatopáncreas

1. Extraiga el hepatopáncreas y colóquelo sobre un portaobjetos de vidrio limpio.
2. Corte el hepatopáncreas longitudinalmente, a lo largo de la línea media.
3. Si se planea preparar improntas para la detección de HPV u otros agentes, hágalo inmediatamente y fijelas tan pronto como sea posible para reducir el efecto de la autólisis.
4. Examine el hepatopáncreas haciendo énfasis en la coloración, textura, focos de melanización, atrofia y cualquier otra característica que parezca anormal.
5. Con la ayuda de unas pinzas de disección finas remueva algunos de los túbulos de la región media y colóquelos sobre una gota de agua de mar limpia en un portaobjetos de vidrio.
6. Coloque un cubreobjetos sobre la preparación y examine:
 - o Gotas de lípidos. Evalúe la cantidad de lípidos presente (puede usar una

2.1.3.3.3 Examen del intestino.

1. Extraiga el intestino haciendo un corte que lo separe del hepatopáncreas (ya hecho en la sección anterior) y del ciego posterior (en el sexto segmento abdominal).
2. Coloque el intestino encima de un portaobjetos limpio de vidrio. Presionando uno de los extremos del intestino con las puntas de unas pinzas de disección, extraiga el contenido intestinal presionándolo hacia afuera por el extremo opuesto deslizando el borde de un cubreobjetos limpio a lo largo del intestino.
3. Agregue una gota de agua de mar limpia al contenido intestinal, dispersándolo si es necesario, y coloque encima un cubreobjetos. Examine la preparación buscando lo siguiente:
 - o Trofozoitos y/o gametocitos de gregarinidos.
 - o Cuerpos de oclusión de baculovirus.

- o Masas melanizadas de hemocitos. Pueden ser indicadores de enteritis hemocítica o vibriosis.

2.1.3.3.4 Examen de músculo y gónadas para determinar la presencia de microsporidios

1. Con la ayuda de un instrumento cortante y unas pinzas, remueva una porción del tejido del que se sospeche la presencia de microsporidios.
2. Frote el tejido en la superficie de un portaobjetos limpio, agregue una gota de agua de mar limpia y coloque encima un cubreobjetos. Examine con el microscopio usando baja intensidad de luz o contraste de fases.
3. Si el hepatopáncreas o las gónadas fueron parasitados por microsporidios, deberán observarse masas de esporas de tamaño y forma uniforme (visibles a 200X-400X).
4. Si se requiere observar las esporas con mayor claridad, la preparación puede ser fijada después de frotar el tejido y teñida con Giemsa o con una tinción tipo ácido resistente (“acid fast”).

2.1.3.4 Muestreo de hemolinfa para la estimación del tiempo de coagulación y cultivo bacteriano.

1. Desinfecte la cutícula del camarón usando ya sea alcohol, hipoclorito al 1% o algún iodoforo al 1%.
2. Con una jeringa para tuberculina (con aguja del #27 o 28) extraiga una muestra de hemolinfa de alguno de los siguientes lugares:
 - o Seno hemal ventral.
 - o Corazón.
 - o Seno hemal orbital.
3. Use algún tipo de anticoagulante (por ejemplo, citrato de sodio al 1%) en las muestras de hemolinfa que serán destinadas para el conteo y análisis de hemocitos. Si usa citrato de sodio al 1%, generalmente basta con una pequeña cantidad (por ejemplo, el volumen que pueda caber dentro de la aguja de la jeringa) para evitar la coagulación. Usted

puede preparar de antemano las jeringas aspirando este pequeño volumen de citrato de sodio antes de proceder con la extracción de la hemolinfa.

4. Las muestras de hemolinfa para el cultivo y aislamiento bacteriano deben ser sembradas directamente en placas de Agar Marino, TCBS u otro medio.
5. Porciones de la muestra de hemolinfa pueden además ser usadas para preparar frotis en portaobjetos de vidrio y examinadas de varias maneras, por ejemplo:
 - o La hemolinfa puede ser diluida con agua de mar esterilizada y examinada directamente con el microscopio para determinar la presencia de bacilos móviles (bacteremia) o parásitos.
 - o La hemolinfa también puede ser fijada ya sea por secado al aire libre, con el calor de una flama o por inmersión en algún agente fijador, y teñida con colorantes tipo Gram, Giemsa u otros que se consideren apropiados para la detección de bacterias o parásitos.
6. Evite el uso de anticoagulante si va a usar la hemolinfa para determinar el tiempo de coagulación.
 - o Inmediatamente después de haber extraído la hemolinfa del camarón, coloque una gota sobre un portaobjetos de vidrio limpio (a temperatura ambiente de laboratorio, ~ 25°C).
 - o Comience a contar el tiempo transcurrido mientras inclina el portaobjetos levemente en varias direcciones.
 - o Anote el tiempo cuando la hemolinfa se coagule.
 - o Tiempo transcurrido = Tiempo de coagulación.

2.2 Métodos histológicos

2.2.1 Diagnóstico histológico

Muchas de las enfermedades reconocidas que afectan a los camarones peneidos son diagnosticadas por medio de análisis histológico rutinario. En la siguiente sección se presentan los métodos para la fijación y la preparación de laminillas.

2.2.2 Importancia de una fijación adecuada

Aunque las técnicas de fijación son de naturaleza simple, son también de la mayor importancia para la correcta preparación de laminillas histológicas. La fijación inadecuada de un espécimen, si no es reconocida como tal, puede resultar en una interpretación errónea de los resultados.

Para empezar, debe tomarse en cuenta que el exoesqueleto quitinoso del camarón, relativamente impermeable, no permite la entrada de la solución fijadora únicamente por inmersión, excepto en larvas y postlarvas tempranas. Aún más, ciertos tejidos del camarón se autolizan con mayor rapidez que tejidos de tipo parecido en otros animales. Por lo tanto, es imperativo que antes de llevar a cabo la fijación por inmersión, se proceda primero a inyectar la solución fijadora en áreas vitales del camarón, tales como el hepatopáncreas.

La rapidez con que se lleva a cabo la fijación es también bastante importante. Los especímenes deberán ser fijados inmediatamente después de haberlos extraído del agua. Se debe de evitar el sacarlos del agua y mantenerlos por ejemplo en hielo, o transportarlos en seco al lugar en donde se llevará a cabo la fijación. Se debe entonces colocar a los camarones en una cubeta o recipiente similar que contenga suficiente agua bien oxigenada y transportarlos de inmediato al lugar en donde se llevará a cabo la fijación.

Se debe tener cuidado también en evitar el estrés que es causado por el manejo excesivo de los camarones antes de la fijación. La histopatología causada por el estrés del manejo (por ejemplo, debida a hipoxia), podría malinterpretarse como el estado en que el camarón se encontraba en su medio ambiente, antes de ser capturado.

2.2.3 Soluciones fijadoras aceptables

Existen varias soluciones fijadoras que han sido utilizadas con éxito variable en la preservación de tejidos de camarón y de otros crustáceos. Entre ellas figuran las siguientes: solución de Helly (Luna, 1968), solución de Bouin (Luna, 1968), formalina al 10% neutralizada (Luna, 1968) y solución de Davidson AFA (Humason, 1972). Es la experiencia de este laboratorio que la solución de Davidson (AFA) es el mayor fijador para procedimientos de histopatología en

general. Los métodos para la preparación de los especímenes se describen con mayor precisión en la siguiente sección.

2.2.4 Selección y colecta de las muestras

Los camarones pueden ser capturados usando cualquiera de los medios que se encuentren disponibles, pero siempre cuidando de no estresarlos innecesariamente al manejarlos. Posteriormente deben ser colocados dentro de un recipiente con agua limpia y bien oxigenada y transportados al laboratorio o lugar en donde serán fijados. En el caso de que los camarones vayan a tener que esperar por un corto tiempo antes de ser fijados, se deberá suministrar aereación adicional en el recipiente.

2.2.4.1 Muestreo no aleatorio en casos de enfermedad

Para el análisis de camarones presuntamente enfermos, seleccione aquellos que se encuentren moribundos, descoloridos, o que se comporten de manera anormal. En el caso de que se requiera determinar la prevalencia de la enfermedad, los animales deben ser muestreados al azar.

2.2.4.2 Muestreo para histología normal

Aquellos camarones que sean muestreados para obtener una referencia de la histología normal, deberán ser completamente normales, tanto en apariencia como en comportamiento. Evite coleccionar camarones que ya estén muertos, excepto cuando se tenga la certeza de que un espécimen haya sucumbido dentro de un lapso de tiempo no mayor de unos minutos. Si a falta de mejor material se vuelve necesario coleccionar animales muertos, se deberá asegurar que se haga una anotación de esta condición y de que se estime el tiempo transcurrido desde la muerte.

2.2.5 Fijación o Preservación

2.2.5.1 Proporción Volumen-Tejido

Antes de comenzar asegúrese de haber preparado suficiente solución fijadora. Como regla general se recomienda usar como mínimo un volumen equivalente a 10 veces el volumen del espécimen a fijar (por ejemplo, para fijar un camarón con un volumen de 10

ml, se deberán utilizar 100 ml de solución fijadora).

2.2.5.2 Preparación de la solución fijadora de Davidson (Alcohol-Formalina-Acido Acético)

La solución fijadora de Davidson deberá prepararse de la siguiente manera (para 1 litro):

- 1) 330 ml alcohol etílico al 95%.
- 2) 220 ml formaldehído (solución saturada con gas formaldehído; concentración final de 37-39%).
- 3) 115 ml ácido acético glacial.
- 4) 335 ml agua corriente (aunque si hay disponibilidad, se prefiere agua destilada).
- 5) Almacenar a temperatura ambiente.

2.2.5.3 Procedimientos para la fijación con solución de Davidson (AFA)

NOTA: Se deben de tomar precauciones para evitar el contacto con la piel o los ojos (use guantes y lentes protectores). En el caso de un accidente, lave inmediatamente la parte expuesta con bastante agua; consulte a un médico.

2.2.5.3.1 Fijación de larvas y postlarvas tempranas

- Después de eliminar el exceso de agua (pasando a los camarones por un tamiz) sumerjalos directamente en en el fijador.
- Mantenga a los especímenes en la solución Davidson por un lapso de 12 a 24 horas y transfíeralos después a alcohol etílico al 50-70% para almacenamiento.

2.2.5.3.2 Fijación de postlarvas tardías, juveniles y adultos

- 1) Con una jeringa inyecte el fijador en el camarón cuando éste aún está vivo. Inyecte de 0.1 a 10 ml, dependiendo del tamaño del camarón. El tamaño de la aguja debe adecuarse al tamaño del camarón, por ejemplo, para la fijación de postlarvas tardías y juveniles pequeños se deberá usar una aguja del número 27.
- 2) El camarón deberá ser inyectado lateralmente, en el hepatopáncreas, en la región anterior al hepatopáncreas, y en la parte anterior, media y posterior del abdomen.

- 3) La cantidad de fijador a inyectar deberá dividirse entre cada una de estas regiones, con el hepatopáncreas recibiendo una cantidad mayor que la región abdominal.
- 4) Como regla general inyecte el equivalente a 5-10% del peso del camarón. Con esto deben de cesar inmediatamente todos los signos vitales del animal y se observará un cambio fuerte de color en las áreas inyectadas.
- 5) Inmediatamente después de la inyección, corte con tijeras la cutícula en un transecto que vaya lateralmente desde el sexto segmento abdominal hasta la base del pedúnculo ocular. Cuide de que el corte sea superficial para no dañar a los tejidos que se encuentran debajo de la cutícula. El corte en la región abdominal deberá ser lateral a la línea media dorsal y el corte en el cefalotorax deberá localizarse en la región medio-lateral.
- 6) Si el camarón es mayor de 12 gramos, entonces se deberán hacer incisiones adicionales. Se deberá cortar transversalmente en la región dorsal, justo después de la unión del cefalotorax con el abdomen y (opcional) en la región media del abdomen.
- 7) Una vez que el camarón ha sido inyectado y cortado, el paso final de fijación es por inmersión sumerjiendo al animal completamente en lo que reste de la solución fijadora.
- 8) Los especímenes deberán ser mantenidos en la solución fijadora, a temperatura ambiente, por un lapso de tiempo de 24 a 72 horas, dependiendo del tamaño del animal (los animales más grandes por más tiempo).
- 9) Una vez transcurrido el tiempo de fijación, los animales deberán ser transferidos a una solución de alcohol etílico al 50-70%, en donde podrán mantenerse por tiempo indefinido.
- 10) Se deberá asegurar también la recolección de información pertinente a las muestras fijadas: condición y apariencia de los especímenes al momento de la colecta, especie, edad, peso, origen de la muestra

(número de identificación del estanque, tanque o “raceway”), origen del camarón (silvestre, de laboratorio, etc.) y cualquier otra información que más adelante pudiera proveer claves para determinar la causa y el origen del problema. Debido a que las notas escritas con tinta pueden ser borradas por el alcohol, es necesario utilizar lápiz, principalmente si las notas serán incluidas con las muestras. Se recomienda también el uso de un papel que no se desintegre por la acción del alcohol (por ejemplo, papel plástico).

2.2.6 Transporte para el procesamiento

- 1) Saque a los camarones de la solución de etanol al 50-70% y envuelvalos en toallas de papel absorbente.
- 2) Coloque a los camarones dentro de una bolsa de plástico de cierre hermético y sature el papel en el que han sido envueltos con etanol al 50-70%.
- 3) Etiquetado: Incluya con las muestras el historial de las mismas, de la manera que ya se indicó en la sección anterior. Asegúrese de que las notas hayan sido escritas a lápiz y en el papel adecuado.
- 4) Cierre la bolsa y colóquela a su vez dentro de otra bolsa de cierre hermético.
- 5) Si se tienen varias bolsas preparadas de esta manera, estas pueden ser empacadas dentro de una bolsa más grande, también con cerrado hermético.

2.2.7 Preparación para el embebido

El seguir una serie de pasos preestablecidos para preparar un espécimen del cual se obtendrán cortes histológicos no es esencial, sin embargo es de bastante ayuda para la correcta visualización de los órganos y sistemas. Por lo tanto, los siguientes procedimientos son presentados con el fin de ayudar en el establecimiento de un método estandarizado, al cual nos referiremos como procedimiento “panorama de branquias-intestino” (este procedimiento atañe a camarones con una longitud total de más de 5.0 cm, a menos que se indique lo contrario):

- 1) Saque a los camarones de la solución de alcohol al 50-70% y colóquelos sobre una superficie limpia en donde serán disectados

(puede ser un bloque pulido de madera, una tabla de plástico, etc.).

- 2) Separe la “cabeza” de la “cola” con la ayuda de una navaja de un sólo filo, haciendo un corte transversal (para camarones de tamaño mayor a los 3.0 cm) posterior a la unión del cefalotórax con el abdomen.
- 3) Corte longitudinalmente el cefalotórax en una posición ligeramente lateral a la línea media (o de ser posible, la totalidad del camarón si el espécimen es menor de 3 cm de longitud total).
- 4) Tome la mitad del cefalotórax que no incluye la línea media y haga un corte diagonal en la región branquiostegal, comenzando en la superficie distal, para extraer las branquias.
- 5) Tome la mitad del cefalotórax que incluye la línea media y haga un corte longitudinal de aproximadamente 5 mm de grosor, comenzando en la parte dorsal-posterior y dirigiendo la navaja hacia la parte ventral-anterior. De esta manera obtendrá una “rebanada” que incluirá la gran mayoría de los tejidos y órganos que se localizan en el cefalotórax; enseguida localice la región de la boca y con la ayuda de unas pinzas de disección de punto fino, con cuidado extraiga y elimine la mandíbula (un cuerpo de consistencia dura).
- 6) Si el estómago y/o intestino contienen arcilla u otro material de consistencia dura, este puede ser eliminado enjuagando cuidadosamente con alcohol al 70%.
- 7) Si los apéndices no van a ser estudiados o si interfieren con el embebido, corte y elimine aproximadamente el 80% de la parte distal de los mismos.
- 8) Con la navaja de un sólo filo, separe del resto del abdomen los segmentos #1, 3 y 6 y corte la parte distal de los urópodos.
- 9) Corte el sexto segmento abdominal longitudinalmente por la mitad de manera similar a como se dividió el cefalotórax.
- 10) Dependiendo del tamaño del camarón y del número de recipientes disponibles para el

infiltrado y embebido, coloque ya sea todas o algunas de las siguientes piezas en los moldes:

- si el espécimen es de menos de 3 cm de longitud total, colóquelo entero, con la parte expuesta de los órganos hacia abajo.
 - la mitad del cefalotorax, con la parte expuesta de los órganos hacia abajo.
 - la región branquiostegal (branquias), con el área cortada hacia arriba (branquias hacia abajo).
 - cortes transversales de los segmentos abdominales #1 y/o #3.
 - corte longitudinal del sexto segmento abdominal con la parte expuesta hacia abajo.
- 11) Los tejidos que sean colocados dentro de las cajas de infiltrado deberán ser de un grosor de no más de 8 mm.
- 12) En el caso de que se requiera de un órgano, sistema o región en particular, los cortes hechos durante la disección deberán ajustarse para que correspondan a esas áreas.

2.2.8 Infiltrado en parafina

La infiltración de los tejidos del camarón en parafina difiere muy poco del de los tejidos de vertebrados. Por lo tanto, es posible obtener información general sobre estos procedimientos en manuales estandar de técnicas histológicas. El objetivo de la siguiente sección es entonces mostrar las técnicas y equipo que son utilizados en nuestro laboratorio y hacer énfasis en aquellas técnicas que son únicas o particularmente útiles cuando se trabaja con tejidos de camarón.

2.2.8.1 Procesamiento de tejidos en un procesador automático

Los tejidos del camarón son procesados rutinariamente en nuestro laboratorio utilizando las siguientes soluciones (en el orden en que se enlistan):

- 1) 70% alcohol etílico (dos baños separados de 1 hora cada uno).
- 2) 80% alcohol etílico (dos baños separados de 1 hora cada uno).
- 3) 95% alcohol etílico (dos baños separados de 1 hora cada uno).
- 4) alcohol etílico absoluto (dos baños separados de 1 hora cada uno).
- 5) xileno o Hemo De (Fisher Scientific). Dos baños separados de 1 hora cada uno.
- 6) parafina [por ejemplo: Paraplast X-TRA (Monoject Scientific)]. Dos baños separados de 1 hora cada uno.

2.2.8.2 Embebido

Una vez que los tejidos han sido satisfactoriamente infiltrados de acuerdo al procedimiento antes mencionado, se colocan en los moldes de embebido para formar los bloques. La formación de los bloques se puede llevar a cabo como se describe más adelante, con el uso de un centro de embebido y con un infiltrador al vacío.

Aunque el centro de embebido puede agilizar el proceso, su uso no es esencial. En su lugar se pueden usar charolas frías y parafina derretida. Sin embargo, antes de proceder con el embebido es recomendable infiltrar las muestras al vacío por aproximadamente 20 minutos. Este paso adicional ayuda a prevenir la infiltración parcial de las muestras.

2.2.9 Corte

El corte (con microtomo) de los tejidos del camarón es también bastante similar al corte de tejidos de vertebrados.

2.2.9.1 Equipo

- 1) Equipo esencial incluye un microtomo de tipo rotatorio y un recipiente amplio en donde sea posible mantener agua a una temperatura constante.
- 2) Si no se utilizan navajas desechables, es necesario contar también con un afilador automático de navajas de microtomo.

- 3) Inclusive para procedimientos de rutina es también recomendable contar con algún manual de técnicas histológicas.

2.2.9.2 Procedimientos especiales

2.2.9.2.1 Tracto gastrointestinal

Cuando se trate de obtener un corte del estómago, del intestino medio o de la parte posterior del tracto intestinal, se deberá de seleccionar el bloque que contenga la pieza de tejido que incluya la línea media. Con el microtomo se deberá de eliminar el exceso de tejido hasta aproximarse a dicha línea media y el tracto pueda ser visto macroscópicamente. Después de llegar a este punto, los cortes que se obtengan pueden comenzar a ser utilizados. En el caso de que el estómago, o el intestino contengan arcilla u otro material que dificulte el corte (por ejemplo, mellado de la navaja), éste puede ser removido con la ayuda de una aguja de disección.

2.2.9.2.2 Método de extendido con etanol.

Hay situaciones en las que resulta bastante difícil extender cortes pequeños o problemáticos en la superficie del agua caliente. Para aliviar este problema, se puede recurrir a lo siguiente. Coloque sobre un portaobjetos de vidrio limpio una porción del listón de cortes que obtuvo con el microtomo y con una pipeta agregue alcohol etílico al 50% en las orillas del listón. El alcohol deberá pasar por capilaridad por debajo de la parafina. Enseguida sumerja el portaobjetos en el agua caliente. El listón deberá desprenderse del portaobjetos y flotar al mismo tiempo que se extiende.

2.2.10 Tinción - H&E de rutina.

2.2.10.1 Hematoxilina-Eosina/Floxina (H&E) de Mayer-Bennett.

Típicamente, las preparaciones histológicas de rutina requieren de una tinción estándar y el camarón no es la excepción. En nuestro laboratorio nosotros utilizamos una modificación a la técnica de hematoxilina-

eosina/Floxina de Mayer-Bennett (Sheehan y Hrapchack, 1980) la cual ha probado ser una excelente tinción H&E de rutina para los tejidos del camarón.

2.2.10.1.1 Preparación del colorante

Hematoxilina de Mayer-Bennett

- Agua destilada caliente 2000 ml
- Hematoxilina 2.0 g
- Iodato de sodio 0.4 g
- Sulfato de aluminio Potásico (12-hidrato) 180 g
- Acido cítrico 2.0 g
- Hidrato de cloral 100 g

Los ingredientes son mezclados en el mismo orden en que se enlistan. Al terminar, el colorante está listo para usarse.

Eosina-Floxina

- Solución “stock” de eosina (solución acuosa de eosina “Y” al 1%) 100 ml
- Solución “stock” de floxina (solución acuosa de floxina B al 1%) 10 ml
- Alcohol etílico al 95% 780 ml
- Ácido acético glacial 4 ml

2.2.10.1.2 Protocolo para la tinción con hematoxilina-eosina/floxina de Mayer-Bennett (H&E):

- a. Hemo De (5 minutos)
- b. Hemo De (5 minutos)
- c. Etanol absoluto (10 sumergidas)
- d. Etanol absoluto (10 sumergidas)
- e. Etanol al 95% (10 sumergidas)
- f. Etanol al 95% (10 sumergidas)
- g. Etanol al 80% (10 sumergidas)
- h. Etanol al 80% (10 sumergidas)
- i. Etanol al 50% (10 sumergidas)
- j. Agua destilada (6 enjuagadas; cambiar el agua después de cada enjuagada)
- k. Hematoxilina (4-6 minutos)
- l. Flujo continuo de agua corriente (4-6 minutos)
- m. Eosina/floxina (2 minutos).
- n. Etanol al 95% (10 sumergidas)
- o. Etanol al 95% (10 sumergidas)
- p. Etanol absoluto (10 sumergidas)
- q. Etanol absoluto (10 sumergidas)
- r. Hemo De (10 sumergidas)
- s. Hemo De (10 sumergidas)
- t. Hemo De (10 sumergidas)

- u. Hemo De (10 sumergidas)
- v. Montar con Permout (Fisher Scienti-fic)
- w. Etiquetar
- o Solución “stock” de floxina B (solución acuosa de floxina B al 1%) 10.0 ml
- o Etanol al 95% 780.0 ml
- o Ácido acético glacial 4.0 ml

2.2.10.2 Hematoxilina-Eosina de Harris (H&E).

Esta es otra tinción que provee resultados excelentes cuando se aplica a tejidos de camarón.

2.2.10.2.1 Preparación del colorante

Hematoxilina de Harris

- o Cristales de hematoxilina 5.0 gr
- o Etanol absoluto 50.0 ml
- o Sulfato de aluminio y potasio 100.0 gr
- o Óxido de mercurio (rojo) 2.5 gr
- o Agua destilada 1000.0 ml

Disolver por separado la hematoxilina en el alcohol y el sulfato en el agua destilada (usando un poco de calor para disolver el sulfato). Mezclar las dos soluciones. Llevar a ebullición tan rápido como sea posible (limitar esta temperatura a menos de un minuto y agitar con frecuencia). Alejar el recipiente de la fuente de calor y agregar lentamente el óxido de mercurio. Llevar a ebullición nuevamente hasta que la solución adquiera un color púrpura oscuro. Remover de la fuente de calor y colocar inmediatamente el recipiente dentro de agua fría por unos minutos. El colorante estará listo para usarse tan pronto como alcance temperatura ambiente. La adición de 2-4 gotas de ácido acético por cada 100 ml de solución incrementa la precisión de la tinción de los núcleos. Filtrar antes de usar.

Preparación del alcohol ácido

- o Etanol al 70% 1000.0 ml
- o Ácido clorhídrico concentrado 10.0 ml

Preparación del agua con amonía

- o Agua corriente 1000.0 ml
- o Hidróxido de amonía (28%) 2-3 ml

Solución saturada de carbonato de Litio

- o Carbonato de litio 1.0 gm
- o Agua destilada 100.0 ml

Eosina-floxina

- o Solución “stock” de eosina (eosina “Y” acuosa al 1%) 100.0 ml

2.2.10.2.2 Protocolo para la tinción con hematoxilina-eosina Y/floxina B de Harris (H&E).

- a) Remover la parafina y rehidratar.
- b) Hematoxilina de Harris (15 minutos).
- c) Enjuagar en agua de la llave.
- d) Diferenciar en alcohol ácido (3 a 10 sumergidas rápidas). Monitorear la diferenciación usando un microscopio. Los núcleos deberán ser fácilmente distinguibles en contraste con el fondo que deberá estar teñido muy ligeramente o no del todo.
- e) Lavar brevemente en agua corriente.
- f) Sumergir en agua amoniacal, o en agua con carbonato de litio, hasta que los cortes adquieran una coloración azul brillante (de 3 a 5 sumergidas).
- g) Lavar en agua corriente de 10 a 20 minutos. Si este lavado no se lleva a cabo adecuadamente, la tinción con eosina no será homogénea.
- h) Teñir con eosina por un período de tiempo de 15 segundos a 2 minutos, dependiendo de que tan “vieja” sea la eosina y de la intensidad que se quiera alcanzar en la contra-tinción. Para obtener una tinción más homogénea, sumerja varias veces las laminillas en la eosina antes de dejarlas completamente sumergidas por el tiempo que se haya seleccionado.
- i) Deshidratar en etanol al 95% y en etanol absoluto hasta haber removido el exceso de eosina; use dos cambios de etanol de 2 minutos cada uno. Revisar la tinción en el microscopio.
- j) Alcohol absoluto, dos cambios de 3

minutos cada uno.

- k) Hemo De, dos cambios de 2 minutos cada uno.
- l) Montar en Permout.

2.3 Preparación de muestras para pruebas de tipo serológico y de hibridación con sondas genéticas en formato de “dot blot”.

2.3.1 Fundamento

Para que este tipo de pruebas funcione, es necesario facilitar el acceso de los anticuerpos (en el caso de pruebas serológicas) o de las “sondas genéticas” (en el caso de hibridación con sondas genéticas marcadas) a los antígenos y/o ácidos nucleicos del patógeno que se necesita detectar. Por lo tanto, el tipo de muestra que se necesita para estas pruebas debe consistir de homogenizados de camarón entero, o bien de algún órgano en particular. También se puede usar hemolinfa.

La hemolinfa puede ser extraída (de animales de aproximadamente 5 gramos o mayores) utilizando una jeringa de tipo tuberculina y haciendo una punción en el corazón o en alguna de las lagunas hemales. La hemolinfa es el tipo de muestra preferida para diagnosticar enfermedades sistémicas tales como IHHNV, WSSV, YHV, y TSV y también puede ser usada directamente para otro tipo de pruebas.

Los homogenizados de camarón pueden ser preparados de varias maneras dependiendo de el tamaño del camarón, disponibilidad de muestra, y el tipo de prueba en el cual será utilizado. Por ejemplo, la “cabeza” (cefalotórax) de el camarón (de la cual se han eliminado los ojos, la “cola” y el caparazón) es utilizada con frecuencia en la preparación de homogenizados para su aplicación en pruebas tipo ELISA y de hibridación en “dot-blot”. Este procedimiento funciona bien si los camarones son de 1 a 15 gr de peso. Camarones más pequeños (por ejemplo, post-larvas y pequeños juveniles) pueden homogenizarse enteros. Los camarones excesivamente grandes representan un problema ya que se requieren grandes volúmenes de soluciones amortiguadoras para llevar a cabo el homogenizado. Cuando los animales son muy grandes la homogenización de ciertos órganos en particular, por ejemplo, las branquias, el cordón nervioso, el hepatopáncreas, u otros

tejidos parece dar resultados muy similares a aquellos que pudieran obtenerse homogenizando la totalidad de la cabeza. Cuando no es posible sacrificar al camarón (por ejemplo, cuando se tienen que analizar camarones reproductores para determinar si son SPF) y es necesario hacer pruebas para determinar la presencia de patógenos sistémicos tales como IHHNV, WSSV, YHV, y TSV, se pueden tomar biopsias (ver el método de biopsias de pleopodos, por ejemplo) o bien muestras de hemolinfa.

2.3.2 Materiales y métodos

2.3.2.1 Solución amortiguadora “TN”

En las pruebas de ELISA y de “dot blot” se ha utilizado con éxito la siguiente solución amortiguadora: 20 mM Tris/0.4 M NaCl pH 7.4. Para prepararla mezcle 3.152 gr de Tris HCl y 23.376 gr de NaCl en un volumen de agua destilada de 1 litro. Una vez disueltos, el pH debe ajustarse a 7.4. La solución se esteriliza en autoclave y posteriormente se almacena en refrigeración.

2.3.2.2 Preparación de muestras homogenizadas.

Utilice de 2 a 4 ml de esta solución amortiguadora por cada gramo de tejido a homogenizar. Homogenice completamente utilizando ya sea un homogenizador mecánico o uno de mano. Centrifugue la preparación a 10,000 rpm (rotor SS 34) por 15 minutos a 4°C para precipitar los desechos. Decante el fluido sobrenadante y almacene a -70°C.

Para la preparación de homogenizados a partir de biopsias de pleopodos por ejemplo, sujete con unas pinzas uno de los extremos del apéndice y con otro par de pinzas force el tejido hacia afuera de la cutícula que lo rodea depositándolo en un tubo de microcentrífuga. En seguida agregue 1-3 ml de solución amortiguadora y homogenice manualmente con la ayuda de un “pestle”. Centrifugue para sedimentar los restos que no fueron homogenizados (cutícula, etc.) y utilice el sobrenadante para la prueba.

2.3.2.3 Preparación de muestras de hemolinfa.

Cubra con citrato de sodio al 10% el interior de la aguja que se usará para la obtención de hemolinfa. Use directamente la muestra para cubrir el fondo de las placas de ensayo de ELISA. En el caso de “dot blot”, puede usar la muestra de hemolinfa directamente y aplicar una o dos gotas en la membrana de ensayo o bien puede diluirla antes de la aplicación.

2.3.2.4 Preparación de la prueba de “Dot Blot”

Use 1 µl de homogenizado de tejido (o hemolinfa) preparado de la manera que ya se explicó para ser aplicado a la superficie de la membrana de “dot blot” o para hacer diluciones. Las diluciones deben ser hechas con solución amortiguadora TN.

2.4 Prueba de hibridación con sondas genéticas en formato “dot blot”.

2.4.1 Fundamento

IHHNV, WSSV, TSV y otros patógenos de camarones peneidos pueden ser detectados en muestras de tejidos homogenizados usando pruebas de hibridación con sondas genéticas específicas. Dichas sondas son aplicadas a muestras de tejido homogenizado el cual ha sido inmovilizado en una membrana de nylon o de nitrocelulosa. Las sondas pueden ser obtenidas a través de DiaXotics Inc. Este tipo de sonda está marcada con una etiqueta química no radioactiva conocida como digoxigenina-11-dUTP (DIG-11-dUTP). El siguiente protocolo hace uso del sistema Genius™, desarrollado por Boehringer Mannheim Biochemicals, y fué adaptado a partir de *Sistema Genius™ Guía del usuario para la hibridación en membranas (Genius™ System User's Guide for Membrane Hybridization)*.

2.4.2 Preparación de las muestras (ver Sección 2.3)

2.4.3 Procedimiento (para el tipo de reactivos necesarios, ver Sección 2.4.4)

1. Prepare la membrana (siempre use guantes y pinzas limpias para manipular la membrana). Corte piezas de 4x5 cm y con un lápiz trace una cuadrícula para acomodar un total de 18 muestras y dos controles (esto equivale a 1 cm² por cada muestra). Humedezca la membrana en solución de 5xSSC por un lapso de 2-5 minutos y luego deje que seque antes de aplicar las muestras.

2. Si usted lo desea, las muestras pueden ser diluidas en solución amortiguadora TN. Para llevar a cabo la dilución use 1 µl de muestra por cada 9µl de solución (esto resultará en una dilución 1:10). Las muestras deberán ser colocadas en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml de capacidad con tapa de cierre hermético. Asegure cada uno de los tubos con un “candado” o seguro de plástico especial para tubos de microcentrifuga. En cada membrana se deberá de incluir un control negativo y uno positivo.

3. Hierva las muestras dentro de los tubos por un lapso de 10 minutos e inmediatamente enfríe en hielo por 2 minutos. Centrifugue los tubos brevemente en un medio ambiente frío (las muestras deben de mantenerse a baja temperatura para prevenir que las cadenas de ADN se vuelvan a cerrar) para que todo el líquido se concentre en el fondo del tubo y para precipitar la proteína coagulada. Manteniendo los tubos en hielo, aplique el volumen de muestra en la membrana trabajando tan rápido como sea posible. Si se usa hemolinfa sin diluir, la mayoría de la muestra se coagulará durante el hervido, por lo tanto hierva por lo menos 20 µl de hemolinfa para que de esa manera quede suficiente líquido que pueda ser usado en la membrana.

4. Aplique 1 µl de cada muestra en el lugar que le corresponda en la membrana. Asegurese de que se use sólo la porción líquida de la muestra ya que la proteína coagulada puede ocasionar que la sonda reaccione de manera no específica. Después de aplicar las muestras en la membrana, deje que esta se seque al aire y entonces proceda a fijarlas de la siguiente manera: en el caso de membranas de nitrocelulosa, estas deben de ser calentadas por 2 horas a 80°C en un horno al vacío; si se usan membranas cargadas positivamente, éstas pueden ser calentadas por 30 minutos a 120°C en un horno al vacío o bien pueden ser expuestas a luz ultravioleta por 3 minutos (para este propósito se puede utilizar un transiluminador ultravioleta).

5. Mientras que el ADN es fijado a la membrana, prepare un baño de agua a 68°C y aliste la solución de pre-hibridación. Prepare 6 ml por cada membrana. Coloque

la solución pre-hibridadora en una placa caliente con agitador y mezcle constantemente hasta que el agente bloqueador se haya disuelto y la solución se haya tornado opaca. Con la ayuda de un sellador de plástico al calor, prepare también varias bolsas de tamaño ligeramente mayor al de las membranas (será necesario preparar de 5 a 6 bolsas por membrana).

6. Remueva la membrana del horno o del transiluminador ultravioleta y colóquela dentro de una de las bolsas previamente preparadas. Agregue 4 ml de solución pre-hibridadora, selle la bolsa, e incube por 0.5 horas sumergiéndola en el baño de agua a 68°C. Agite ocasionalmente.
7. Hierva la sonda por 10 minutos, colóquela inmediatamente en hielo y centrifugue brevemente en el frío para concentrar en el fondo del tubo todo el líquido condensado (la sonda debe de mantenerse a baja temperatura para prevenir que las cadenas de ADN se cierren). Mantenga la sonda en el hielo. Saque la membrana del baño a 68°C y vacíe la solución pre-hibridadora. Agregue a la bolsa 1 ml de solución pre-hibridadora fresca y, mezclando bien al momento que es agregada, añada la cantidad correcta de sonda. Otra opción es agregar la sonda a la solución pre-hibridadora fría y mezclarla bien antes de ponerla en la bolsa. Selle la bolsa, colóquela nuevamente en el baño de agua a 68°C e incube hasta el día siguiente. Agite la bolsa varias veces antes de dejarla incubando toda la noche.
8. Luego de que la membrana ha sido incubada durante toda la noche, transfírela a una bolsa limpia. Lave la membrana de la siguiente manera usando por lo menos 4 ml de las soluciones que se indican (elimine de la bolsa una solución antes de agregar la siguiente):

2x SSC/0.1% SDS	2 veces	5 min	TA*
0.1x SSC/0.1% SDS	3 veces	15 min	68°C
Sol. amortiguadora I	1 vez	5 min	TA

*Nota: TA=Temperatura ambiente

9. Al tiempo que se hacen los lavados a la membrana, prepare la solución amortiguadora II (solución bloqueadora). Prepare 6 ml por cada membrana. Coloque la solución en una placa caliente con agitador y

mezcle por 30 minutos a temperatura tibia hasta que el agente bloqueador se haya disuelto por completo y la solución se haya tornado turbia. Al terminar, deje que la solución se enfríe un poco antes de usarla.

10. Transfiera la membrana a una bolsa limpia y agregue 3 ml de solución bloqueadora. Incube a TA por 30 minutos.
11. Vacíe la solución bloqueadora y reemplazela con 2 ml de anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (AP) diluido 1:5000 con solución bloqueadora fresca. Selle la bolsa e incube a TA por 30-45 minutos en una plataforma con agitación.

12. Saque la membrana de la bolsa, colóquela en un recipiente limpio (puede ser una caja de Petri), y efectúe los siguientes lavados:

Sol. amortiguadora I	2 veces	15 min	TA
Sol. amortiguadora III	1 vez	5 min	TA

*Nota: TA=Temperatura ambiente

13. Proceda a “revelar” las membranas colocándolas dentro de bolsas limpias y agregando 2 ml de solución reveladora recién preparada. Revele las membranas en un sitio oscuro (puede ser dentro de una caja de cartón pequeña), a TA, por un lapso de tiempo de 2 a 18 horas. Detenga la reacción de revelado sacando las membranas de las bolsas y sumergiéndolas en solución amortiguadora IV por 15 min a TA. Deje secar las membranas en un lugar oscuro y sobre una pieza de papel absorbente. Tome una fotografía de los resultados. Una vez seca, la membrana puede guardarse dentro de una bolsa de plástico sellada al calor.

2.4.4 Reactivos necesarios para la hibridación en formato “Dot-Blot”.

Solución amortiguadora para la dilución de muestras (Sol. amortiguadora IV más 50 Fg/ml de ADN de esperma de salmón)

Prepare el ADN de esperma de salmón de la siguiente manera:

- o Disolver 2.5 mg de ADN de esperma de salmón en 5 ml de agua bi-distilada (500 Fg/ml).

- Deshebre el ADN pasándolo varias veces a través de una jeringa con aguja del número 18-20.
- Hervir el ADN por 10-15 minutos para desnaturalizarlo.
- Filtre 45 ml de solución amortiguadora IV (1X) utilizando un filtro de jeringa de 0.45 µm.
- Mezcle 5 ml de esperma de salmón, previamente deshebrado y desnaturalizado, con 45 ml de solución amortiguadora IV.
- Guarde la preparación a -20°C. La cantidad a usar inmediatamente se puede mantener a 4°C.

Solución amortiguadora 20xSSC (cloruro de sodio/citrato de sodio)

3M NaCl	175.32 g NaCl
0.3M citrato de Na	88.23 g citrato de Na.2H ₂ O
H ₂ O bidestilada	900 ml (aforar a 1litro)

Nota:

- ajustar pH a 7.0
- esterilizar en autoclave
- mantener a 4°C

Solución amortiguadora 5xSSC

5x SSC	250 ml de 20x SSC
H ₂ O bidestilada	750 ml

Nota:

- filtrar a 0.45 µm
- mantener a 4°C

Solución pre-hibridadora (prepare la solución 30 minutos antes de usarla)

Agente bloqueador 1%	0.1 g agente bloqueador #11 (kit Genius™ 1)
Sarkosyl 0.1%:	50 µl de sarkosyl al 20%
SDS 0.02%	20 µl SDS al 10%
Solución amortiguadora 5x SSC	10 ml 5x SSC

Nota:

- Disolver con agitación a temperatura tibia por 30 minutos.

Soluciones amortiguadoras de lavado (mantener a TA)

2x SSC, 0.1% SDS: - 2xSSC - H ₂ O bidestilada - filtrar a 0.45 µm - 0.1% SDS	100 ml 20x SSC 895 ml 5 ml 20% SDS
0.1x SSC, 0.1% SDS: - 0.1x SSC - H ₂ O bidestilada - filtrar a 0.45 µm - 0.1% SDS	5 ml 20x SSC 990 ml 5 ml 20% SDS

Solución amortiguadora I (10x)

1M Tris-HCl	12.11 g Tris básico
1.5M NaCl	8.77 g NaCl
H ₂ O bidestilada	900 ml (aforar a 1 litro)

Nota:

- ajustar pH a 7.5 con HCl
- esterilizar en autoclave
- mantener a 4°C
- Para preparar la solución amortiguadora I a una concentración de 1x, diluya 100 ml de la solución madre (10x) en 900 ml de agua bidestilada; filtrar a 0.45 µm; mantener a 4°C.

Solución amortiguadora II

Agente Bloqueador al 0.5%	0.05 g agente bloqueador #11 (Genius™ 1 kit)
Sol. amortiguadora I	10 ml

Nota:

- disolver con agitación a temperatura tibia por 30 minutos.

Solución amortiguadora III

100mM Tris-HCl	12.11 g Tris básico
100mM NaCl	5.84 g NaCl
H ₂ O bidestilada	1000 ml
- ajustar pH a 9.5 con HCl	
50mM MgCl ₂	10.16 g MgCl ₂ .6H ₂ O

Nota:

- filtrar a 0.45 µm
- mantener a 4°C

Solución amortiguadora IV (10x)

100mM Tris-HCl	1.21 g Tris básico
10mM EDTA	0.37 g EDTA.2H ₂ O (sal disódica)
H ₂ O bidestilada	900 ml (aforar a 1 litro)

Nota:

- ajustar pH a 8.0 con HCl
- esterilizar en autoclave
- mantener a 4°C
- Para preparar la solución amortiguadora IV a concentración 1x, diluya 100 ml de solución madre (10x) en 900 ml de agua bidestilada; filtre a 0.45 µm; esta solución se debe guardar a 4°C.

Solución reveladora (esta solución no se puede almacenar. Preparar antes de usarla)

Sal de "nitroblue tetrazolium"	4.5 µl NBT ¹
Sal de "5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate, toluidinium"	3.5 µl X-fosfato ²
Solución amortiguadora III	1 ml de solución amortiguadora III 1x

Nota:

- 1) 75 mg/ml en 70% dimetil formamida
- 2) 50 mg/ml en 100% dimetil formamida

2.4.5 Resolución de problemas.

- 1) Muchos de los problemas de tinción no específica de la membrana (“background staining”) pueden ser atribuidos al lavado deficiente de la membrana después de la hibridación con la sonda genética o después de la reacción con el anticuerpo anti-DIG. Si durante el ensayo Usted observa que la membrana se tiñe excesivamente, trate de resolver el problema incrementando el volumen de la solución de lavado o el tiempo de lavado o ambos.
- 2) Las condiciones durante el proceso de hibridación son moderadamente estrictas, sin embargo, si se llegara a requerir de una estrictencia aún más alta, se puede proceder a disminuir la concentración de sal en la solución amortiguadora de prehibridación. Después de la hibridación se puede incluir también un lavado adicional con 0.1x SSC/0.1% SDS a 68°C.
- 3) No intente interpretar los resultados del ensayo si la membrana se ha teñido excesivamente (“background staining”). Mejor repita el ensayo incrementando la estrictencia durante la hibridación o bien el número de lavados.
- 4) El folleto “Genius™ System User's Guide for Membrane Hybridization” (“Sistema Genius™ Guía del Usuario para la hibridación en membranas”) publicado por Boehringer Mannheim Biochemicals, provee información detallada acerca del procedimiento de hibridación con sondas marcadas con DIG y es recomendado como una guía para llevar a cabo este tipo de ensayos.

2.5 Prueba de hibridación con sondas genéticas en formato “in situ”

2.5.1 Fundamento

La hibridación *in situ* permite la detección de secuencias genómicas virales, y de otros tipos, a través del apareamiento o hibridación de dichas secuencias con secuencias complementarias de ADN conocidas como “sondas”. El uso de sondas no radioactivas marcadas con substan-

cias como la digoxigenina-11-dUTP (DIG), proveen un método de detección altamente específico ya que cualquier reacción no específica con los tejidos (que en el caso de hibridación en “dot blot” pudiera resultar en un diagnóstico falso positivo al usar tejidos homogenizados) puede diferenciarse fácilmente de las lesiones histológicas que han reaccionado de manera específica con la sonda. El protocolo que se explica a continuación se basa en el Sistema Genius™ desarrollado por Boehringer Mannheim Biochemicals y fue adaptado del “Manual Genius™ de Aplicaciones de Hibridación in situ No Radiactivo” (Genius™ Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual).

2.5.2 Preparación de las muestras.

Para la aplicación del protocolo de hibridación *in situ* que se describe a continuación se han utilizado con éxito tejidos fijados en solución de Davidson AFA. Otros agentes fijadores, tales como glutaraldehído, también proveen buenos resultados. Cortes de tejido congelado también pueden ser sometidos a este protocolo. Sin embargo, se recomienda consultar el manual “Genius™ Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual” antes de proceder a hacer estas modificaciones en el protocolo.

2.5.3 Procedimiento

- 1) Infiltrar los tejidos en parafina (ver Secciones 2.2.7 y 2.2.8) y obtener cortes de 4 µm o menos de grosor (ver Sección 2.2.9). Flote los cortes en el baño de agua y colóquelos en portaobjetos de vidrio cargados positivamente (Fisher Scientific).
- 2) Caliente las laminillas en un horno a 60°C por 45 minutos.
- 3) Rehidrate los tejidos de la siguiente manera:

Xileno	3 veces	5 min c/u
Etanol absoluto	2 veces	1 min c/u
Etanol al 95%	2 veces	1 min c/u
Etanol al 80%	2 veces	1 min c/u
Etanol al 50%	1 vez	1 min
Agua destilada (no deje que los cortes se sequen)	6 cambios de agua rápidos	
TNE 1x	1 vez	5 min

- 4) Prepare Proteinasa K (PK) fresca a una concentración de 100 µg/ml en 1x TNE. Pipetee 1 ml de la solución de PK sobre el espécimen en la laminilla acomodada horizontalmente. Incubar por 15 min en una cámara húmeda a 37°C.
- 5) Transfiera las laminillas a una solución de formaldehído al 0.4% por 5 min a TA. Posteriormente lave las laminillas en 2x SSC por 5 min a TA.
- 6) Acomode las laminillas horizontalmente dentro de la cámara húmeda y cubra los cortes con 0.5 ml de solución pre-hibridizadora. Incube a 37°C por un mínimo de 30 min.
- 7) Justo antes de usarlo, hierva el volumen requerido de sonda por 10 min; enfríe rápidamente en hielo; centrifugue brevemente en frío para concentrar el agua de condensación; mantenga la sonda en el hielo para prevenir el cierre de las cadenas de ADN.
- 8) En el caso de IHHNV, HPV y TSV: Diluya la sonda a una concentración de 10-25 ng/ml en solución hibridizadora y cubra el espécimen con 0.25 ml de la solución.

En el caso de BP, MBV, WSSV y NHP: En este paso se necesita someter la muestra a ebullición para desnaturalizar o abrir las cadenas dobles de ADN (dsDNA) del patógeno que se quiere detectar. Diluya la sonda a una concentración de 10-25 ng/ml en solución hibridizadora y cubra el espécimen con 0.5 ml de la solución. Coloque la laminilla con al sonda sobre un baño de agua hirviendo por 6 min (la temperatura en la laminilla debe de alcanzar 95°C). Enfríe rápidamente las laminillas en hielo por 5 minutos y proceda después a incubar la preparación toda la noche.

- 9) Incube las laminillas dentro de una cámara húmeda toda la noche, a 37°C (IHHNV y HPV) o a 42°C (BP, MBV, WSBV, NHP, TSV y YHV). Coloque las soluciones de lavado en una incubadora a 37°C (ver el paso 10).
- 10) Siguiendo la secuencia que se detalla a continuación, proceda a lavar las laminillas en las soluciones amortiguadoras previa-

mente calentadas a 37°C (también ver paso 11):

2xSSC	2 veces	5 min c/u	37°C
1xSSC	2 veces	5 min c/u	37°C
0.5xSSC	2 veces	5 min c/u	37°C
0.1xSSC	2 veces	5 min c/u	37°C
1x Solución amortiguadora I	1 vez	5 min	TA

- 11) Mientras lava las laminillas, prepare la solución amortiguadora II (solución bloqueadora). Prepare 1 ml por cada laminilla (ver sección 2.5.4). Deje que la solución alcance TA antes de usarla. Con las laminillas en posición horizontal cubra el espécimen con 0.5 ml de la solución bloqueadora. Incube dentro de la cámara húmeda por 15 min a 37°C.
- 12) Justo antes de usarlo, diluya en solución amortiguadora II el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP). Dependiendo de la concentración de sonda que se haya utilizado, el anticuerpo deberá ser diluido a 1:1000 o 1:5000 (a mayor concentración de sonda, mayor deberá ser la dilución). Cubra cada uno de los especímenes con 0.5 ml de anti-DIG-AP diluido e incube en una cámara húmeda por 30-45 min a 37°C (incube por 30 min si el anti-DIG-AP es nuevo o 45 min si es viejo). Al terminar, lave 2 veces (5 minutos cada lavado) las laminillas en solución amortiguadora I, a TA.
- 13) Transfiera las laminillas a la solución amortiguadora III por 5 min a TA.
- 14) Prepare la solución reveladora justo antes de usarla. Agregue 0.5 ml de esta solución a cada una de las laminillas e incúbelas en posición horizontal dentro de una cámara húmeda, en un lugar oscuro a TA por 2-3 horas. Después de la primera hora, revise intermitentemente la reacción en el espécimen que haga las veces de control positivo: con el objetivo de menor aumento, determine la presencia de un precipitado azul oscuro o negro en los tejidos adecuados. Detenga la reacción cuando el control positivo muestre un revelado óptimo. Algunas sondas requieren de un tiempo de revelado bastante corto por lo que es importante no dejar que la muestra reaccione en

exceso; un tinte azulado en todos los tejidos es una señal de dicho exceso.

15) Detenga la reacción de revelado sumergiendo las laminillas en solución amortiguadora IV por 15 min a TA. Enjuague en agua destilada.

16) Proceda a teñir los especímenes con Bismarck Brown Y a TA por 1 min.

17) Deshidrate los especímenes de la siguiente manera:

Etanol al 95%	1 vez	1 min
Etanol absoluto	3 veces	1 min c/u
Xileno (o sustituto)	4 veces	1 min c/u

Nota:

No permita que las preparaciones se sequen. Manténgalas en xileno (o su sustituto) hasta que vaya a hacer el montaje permanente con resina.

18) Finalice en montaje usando la resina de su preferencia (por ejemplo, Permout).

19) Examine las preparaciones con un microscopio. Busque evidencia de la deposición de un precipitado azul oscuro o negro y/o lesiones específicas a nivel histopatológico que hayan sido marcadas por la sonda:

- IHHNV: busque cuerpos de inclusión intranuclear tipo Cowdry A (CAIs) en células de origen ecto y mesodérmico (por ejemplo: branquias, tejido hematopoiético, cordón ventral nervioso, etc.) los cuales deberán mostrar una coloración azul oscuro o negro así como también otros depósitos asociados con masas citoplasmáticas del virus o núcleos infectados que no muestren la presencia de inclusiones patodiagnósticas (CAIs).
- HPV: busque inclusiones intranucleares, generalmente esféricas, en las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas las cuales deberán de mostrar una coloración azul oscuro o negro.
- WSSV: busque cuerpos de inclusión intranucleares en células del epitelio cuticular, tejido conectivo, epitelio de la glándula antenal, y células parenquimales del órgano linfoide y de los órganos hematopoiéticos. Las inclusiones deberán de estar teñidas de azul oscuro o negro así como también otros depósitos

asociados con masas citoplasmáticas del virus, o núcleos infectados sin la presencia de inclusiones patodiagnósticas.

- NHP: busque depósitos de color azul oscuro o negro dentro de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas. Dichos depósitos pueden aparecer difusos debido a las masas de bacterias, pero en ocasiones se pueden distinguir las formas cilíndricas de las mismas.
- TSV: durante la etapa aguda de la enfermedad, busque la señal positiva de la sonda en el epitelio cuticular del cuerpo y apéndices en general, en las branquias, en el intestino posterior, esófago y estómago. Con frecuencia, estas señales se encuentran cerca de lesiones necróticas donde también se pueden observar núcleos picnóticos y kariorréticos (los cuales no reaccionan con la sonda). Durante la etapa crónica de la enfermedad, la reacción a la sonda se observa principalmente en el citoplasma de las células parenquimales del órgano linfoide.
- YHV: la reacción positiva a la sonda se observa en la forma de depósitos de color azul oscuro o negro, los cuales están localizados en el citoplasma de las células afectadas o bien entre los restos necróticos de células infectadas. Tejidos u órganos en donde se pueden encontrar estas reacciones a la sonda incluyen: epitelio cuticular de cuerpo y branquias, células parenquimales y tejido conectivo del órgano linfoide, células mioepiteliales y tejido conectivo del hepatopáncreas, tejido conectivo del músculo, pericardio y células fagocíticas dentro del corazón, tejido conectivo fibroso de la glándula antenal, células gliales del cordón nervioso, tejido conectivo de los órganos hematopoiéticos y tejido conectivo de los ciegos intestinales.

20) Instrucciones adicionales:

- Las muestras deberán tomarse de animales moribundos (no muertos) y deberán de estar bien fijadas. El agente fijador deberá ser reemplazado con etanol al 70% después de 24 horas. Es recomendable

hacer por lo menos 2 cambios de etanol al 70%, uno cada 24 horas.

- Proceda a cortar los tejidos en el microtomo el día anterior al ensayo de hibridación *in situ*, no antes (esto incluye al control positivo). Las laminillas deberán calentarse (paso #2) justo antes de comenzar el ensayo asegurándose de que la temperatura no exceda 60°C.
- En cada corrida de hibridación *in situ* se deberá incluir siempre un control histológicamente positivo y uno negativo (SPF= Specific Pathogen Free/Libre de patógenos específicos).
- Si la muestra ha sido enviada por una fuente externa, existe la posibilidad de que no haya sido preparada apropiadamente y que el resultado del ensayo sea falso-negativo. Por lo tanto, paralelamente se debería llevar a cabo histología convencional con tinción H&E.

2.5.4 Reactivos

10x Tris NaCl EDTA (TNE)

500mM Tris-HCl	60.57 g Tris Base
100mM NaCl	5.84 g NaCl
10mM EDTA	3.72 g EDTA.2H ₂ O (sal di-sódica)
H ₂ O bidestilada	900 ml (aforar a 1 lt)

Nota:

- Ajustar el pH a 7.4 con HCl
- Esterilizar en autoclave
- Mantener a 4°C
- Para preparar la solución TNE a una concentración de 1x, diluya 100 ml de la solución madre (10x) en 900 ml de agua bidestilada, filtrar a 0.45 µm y mantener a 4°C.

Proteinasas K (prepar justo antes de usar)

1x TNE	10 ml 1x TNE
Proteinasas K	1 mg Proteinasas K

0.4% Formaldehído

Formaldehído al 37%	5.4 ml
H ₂ O bidestilada	495 ml

Nota:

Esta solución se puede mantener a 4°C hasta por 2 meses.

Solución amortiguadora de hibridación (50 ml volumen final)

4x SSC	10 ml 20x SSC
--------	---------------

50% Formamida	25 ml 100% Formamida
1x Denhardt's	2.5 ml 20x Denhardt's
5% Sulfato de Dextran	10 ml 25x Sulfato de Dextran
0.5 mg/ml DNA	2.5 ml:10 mg/ml DNA de esperma de salmón

Nota:

Esta solución se debe mantener a 4°C.

20x SSC (cloruro de sodio/ citrato de sodio)

3M NaCl	175.32 g NaCl
0.3M Citrato de Na	88.23 g Citrato de Na.2H ₂ O
H ₂ O bidestilada (DD)	900 ml (aforar a 1 lt)

Nota:

- Ajustar pH a 7.0
- Esterilizar en autoclave
- Almacenar a 4°C
- Diluciones:
 - Para preparar 2x SSC, diluya 100 ml de 20x SSC en 900 ml DD H₂O; filtrar a 0.45 µm; guardar a 4°C.
 - Para preparar 1x SSC, diluya 50 ml de 20x SSC en 950 ml DD H₂O; filtrar a 0.45 µm; guardar a 4°C.
 - Para preparar 0.5x SSC, diluya 25 ml de 20x SSC en 975 ml DD H₂O; filtrar a 0.45 µm; guardar a 4°C.
 - Para preparar 0.1x SSC, diluya 5 ml de 20x SSC en 995 ml DD H₂O; filtrar a 0.45 µm; guardar a 4°C.

Solución de Denhardt 20x

0.4% BSA (Bovine Serum Albumin, Fraction V)	0.4 g Albúmina de suero bovino, Fracción V
0.4% Ficoll	0.4 g Ficoll 400
0.4% PVP 360	0.4 g Polivinilpirrolidona 360
H ₂ O bidestilada	100 ml

Nota:

- Filtrar a 0.45 µm
- Guardar a 4°C

Sulfato de dextran al 25%

25% Sulfato de dextran	25 g Sulfato de dextran
H ₂ O bidestilada	80 ml (aforar a 100 ml)

Nota:

Disolver el sulfato en agua tibia; distribuya en porciones de 10 ml por tubo; esta solución debe guardarse congelada a -20°C.

ADN de Esperma de salmón (10 mg/ml)

ADN de esperma de salmón	500 mg
H ₂ O bidestilada	40 ml (aforar a 50 ml)

Nota:

Agregue el ADN lentamente al agua al tiempo que calienta a temperatura tibia (~37-40°C); pase la solución varias veces a través de una jeringa con aguja del número 18; esterilice en autoclave para desnaturalizar aun más el ADN; distribuya en pequeños tubos en porciones de 2.5 ml; esta solución debe de guardarse congelada a -20°C.

Solución amortiguadora I (10x)

1M Tris-HCl	121.1 g Tris Base
1.5M NaCl	87.7 g NaCl
H ₂ O bidestilada	900 ml (aforar a 1 lt)

Nota:

- Ajustar el pH a 7.5 con HCl
- Esterilizar en autoclave
- Guardar a 4°C.
- Para preparar esta solución a una concentración de 1x, diluya 100 ml de solución madre (10x) en 900 ml de agua bidestilada; filtrar a 0.45 µm; guardar a 4°C.

Solución amortiguadora II

Agente bloqueador al 0.5%	0.5 g de reactivo agente bloqueador #11 (Genius™ I kit)
Sol. Amortiguadora I (1x)	100 ml de sol. Amortiguadora I (1x)

Nota:

Disolver el reactivo mientras agita y calienta a temperatura tibia por 30 min. Esta solución se puede guardar a 4°C hasta por una semana.

Solución amortiguadora III

100mM Tris-HCl	12.11 g Tris Base
100mM NaCl	5.84 g NaCl
H ₂ O bidestilada	990 ml (aforar a 1 lt)

Nota:

- Ajustar el pH a 9.5 con HCl
- Agregar 50mM MgCl₂ (10.16 g MgCl₂·6H₂O)
- Filtrar a 0.45 µm
- Guardar a 4°C.

Solución amortiguadora IV (10x)

100mM Tris-HCl	12.10 g Tris Base
10mM EDTA	3.72 g EDTA·2H ₂ O (sal disódica)
H ₂ O bidestilada	990 ml (aforar a 1 lt)

Nota:

- Ajustar el pH a 8.0 con HCl
- Esterilizar en autoclave
- Guardar a 4°C.
- Para preparar sol. amortiguadora IV a una concentración de 1x, diluya 100 ml de solución madre (10x) en 900 ml de agua bidestilada; filtrar a 0.45 µm; guardar a 4°C.

Alcohol polivinílico (PVA) al 10%

10% PVA	10 g Alcohol polivinílico (30,000-70,000 PM)
H ₂ O bidestilada	90 ml (aforar a 100 ml)

Nota:

- Disolver agitando; puede calentar a temperatura tibia para facilitar el mezclado
- Distribuya en tubos en porciones de 10 ml por tubo.
- Guarde bajo congelación a -20°C.

Solución reveladora (agregue NBT y X-Fosfatasa justo antes de usar)

Sol. amortiguadora III (1x)	90 ml Sol. Amortiguadora III
1% PVA	10 ml de alcohol polivinílico al 10%

Nota:

- Mezclar y guardar a 4°C.
- Justo antes de usar prepare de la siguiente manera (por cada ml de sol. reveladora):
 - 4.5 µl NBT (75 mg/ml en 70% dimetil-formamida)
 - 3.5 µl X-Phosphate (50 mg/ml en 100% dimetil-formamida)

Bismarck Brown Y al 0.5%

0.5% Bismarck Brown Y	5 g Bismarck Brown Y
H ₂ O bidestilada	1000 ml

Nota:

- Agitar hasta completa disolución
- Filtrar con papel filtro (Whatman#1)
- Guardar a TA.

2.5.5 Resolución de problemas.

1. Generalmente los problemas de tinción no específica (“background”) pueden ser minimizados al incrementar el volumen de la solución de lavado, el tiempo de lavado, o ambos. La revisión continua del espécimen durante la reacción de revelado también puede ayudar a prevenir dicho “background”. Muchas veces, la cutícula se teñirá de un color azul debido a la reacción no específica del ADN de la sonda con la quitina, pero ésta es fácilmente distinguible de la reacción verdadera que ocurre en los tejidos.
2. Las concentraciones de sonda ya mencionadas (de 10 a 25 ng de sonda marcada con DIG por 1 ml de solución hibridadora) son suficientes en la mayoría de los casos. Estas concentraciones pueden ser incrementadas si así se requiere, sin embargo, los problemas de “background” son más comunes a altas concentraciones de sonda.
3. El manual de Boehringer Mannheim Biochemicals (ahora Roche Biochemicals) titulado *Genius™ System User's Guide for Membrane Hybridization and the Non-radioactive In Situ Hybridization Application Manual* provee información detallada sobre sondas genéticas marcadas con DIG y el procedimiento de hibridación *in situ* y es recomendado como una guía para

llevar a cabo ensayos con sondas genéticas no radioactivas.

Nota: El agente causante del síndrome conocido como NHPS es una bacteria y para poder penetrar la pared celular es necesario incluir un paso adicional antes de llevar a cabo la digestión con Proteinasa K. Prepare lisozima fresca en TNE a una concentración de 100 µg/ml. Pipetee 0.5 ml de esta solución sobre el tejido a analizar, incube a TA por 15 min; lave las laminillas por 5 minutos en TNE y proceda inmediatamente con la Proteinasa K (paso #4).

2.6 Método de PCR (Polymerase Chain Reaction/Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la Detección de Patógenos

2.6.1 Fundamentos

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento utilizado en la amplificación de pequeñas cantidades de ácido desoxirribonucleico (ADN). La amplificación se lleva a cabo con “iniciadores” o “primers” diseñados específicamente para detectar una secuencia de ADN en particular. Para poder sintetizar los iniciadores capaces de detectar virus específicos de camarones peneidos, es necesario conocer al menos parte de la secuencia de ADN de dichos virus. Hoy en día existe un sinnúmero de programas de computadora los cuales pueden ser usados como una herramienta para seleccionar los iniciadores óptimos, siempre y cuando se cuente con las secuencias de ADN del virus que se desea detectar.

El PCR amplifica exponencialmente secuencias de ácido nucleico flanqueadas por los iniciadores específicos para la detección de un patógeno en particular. Dicha amplificación ocurre durante una serie de ciclos de temperatura. Por ejemplo, un ciclo de PCR consiste de tres etapas básicas, completamente dependientes de la temperatura: (1) *desnaturalización* del ácido nucleico, (2) *apareamiento* de los iniciadores con la secuencia complementaria en el ADN del patógeno, (3) *extensión* (o *polimerización*) de la secuencia flanqueada por los iniciadores (dicha polimerización es llevada a cabo por la enzima DNA polimerasa). Luego de una serie de ciclos, el producto amplificado (si se encuentra presente) también conocido como “amplicón”, es sujeto a electroforesis en un gel de agarosa y visualizado al ser expuesto a luz ultravioleta en un transiluminador.

Hoy en día, existen distintas variaciones del PCR. Las pruebas de PCR “anidado” (“nested”

o “two-step” en inglés) han sido desarrolladas con el fin de proveer una sensibilidad mayor que la del PCR de una etapa o “one step” (descrito en el párrafo anterior). En el PCR anidado, se utiliza un segundo par de iniciadores el cual se apareará con una secuencia complementaria que se encuentra presente dentro de los amplicones generados por el primer par de iniciadores. Este segundo (interno) par de iniciadores permite la amplificación de secuencias específicas del patógeno que pudieron ser amplificadas durante la primera etapa, pero que tal vez debido a la pequeña cantidad de ADN del patógeno presente no pudo ser amplificado en cantidad suficiente para ser visualizado en el gel de agarosa. Por otro lado, la desventaja más importante del PCR anidado es su mayor tendencia a la contaminación y a la producción de resultados falso-positivos ocasionados por el acarreamiento al preparar las reacciones para el segundo paso.

2.6.2 Preparación de la muestra

Existen varios tipos de muestras de camarón que han sido utilizadas con éxito en las pruebas de PCR. Estas incluyen: hemolinfa, homogenizados de tejido ya sea fresco, congelado, o fijado en etanol al 95%. La hemolinfa puede ser congelada, en cuyo caso se recomienda el uso de una pequeña cantidad de citrato de sodio al 10% para prevenir la coagulación de la misma (el volumen de citrato que pueda ser contenido dentro de la aguja de la jeringa que se usará para extraer la hemolinfa es suficiente). Si se utiliza citrato de sodio, se debe de tener cuidado en no aplicarlo en exceso ya que puede interferir con la reacción de amplificación del PCR. La hemolinfa puede fijarse también en alcohol al 95% (por lo menos en una proporción de 1:1), en cuyo caso no es necesario usar citrato de sodio ni mantenerla congelada o refrigerada hasta su análisis.

En el caso específico de HPV, se ha desarrollado un método en este laboratorio que hace uso de muestras de heces fecales en crudo tomadas de camarones vivos. En pocas palabras, las heces fecales (0.02 gr) son homogenizadas con 100 :1 de solución salina estéril al 2%, hervidas por 10 min, enfriadas rápidamente en hielo por 1 min, y centrifugadas a 5,000x g por 30 segundos a temperatura ambiente para peletizar todos los sólidos. Enseguida se toma un volumen de 0.5 :1 del sobrenadante para ser utilizado en la reacción de PCR.

El ADN también puede ser extraído de las muestras utilizando “kits” comerciales distribuidos por Roche Molecular Biochemicals (High Pure PCR Template Preparation Kit/Kit para la Preparación de Cadenas de ADN Altamente Purificado) y pueden ser aplicados a la detección de IHHNV, WSSV y HPV. La ventaja del uso de “kits” para la extracción y purificación del ADN es que así se elimina de la muestra una serie de sustancias desconocidas que pudieran llegar a interferir con la reacción de amplificación (como por ejemplo en el caso de las heces fecales).

2.6.3 Secuencias de los iniciadores

- **IHHNV:** La secuencia del iniciador hacia adelante (“forward”) es 5’ CGG ACA ATA TCC CTG ACT 3’ y la del iniciador hacia atrás (“reverse”) es 5’ ATC GGT GCA CTA CTC GGA 3’. Este par de iniciadores amplifica un fragmento (amplicón) de 1681 pares de bases (bp).
- **WSSV:** En el PCR de dos etapas o “anidado”, el par de iniciadores externos produce un amplicón de 1447 bp (Lo et al. 1996). Las secuencias del primer par de iniciadores (externos) son (hacia adelante) 5’ ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG 3’ y (hacia atrás) 5’ TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A 3’. Las secuencias de los iniciadores internos (anidados) son (hacia adelante) 5’ GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A 3’ y (hacia atrás) 5’ TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T 3’. El par interno de iniciadores produce un amplicón de 941 bp. El PCR anidado es uno de los procedimientos utilizados rutinariamente en la detección de WSSV en animales provenientes de granjas.

Se ha desarrollado también un segundo grupo de iniciadores en base a las secuencias de ADN del WSSV disponibles en el *GeneBank* (U50923). Las secuencias de los iniciadores son (hacia adelante) 5’ CCT TCC ATC TCC ACC ACA CTT 3’ y (hacia atrás) 5’ CTG TTC CTT GGC AGA GCA TTC 3’. Este par de iniciadores produce un amplicón de 489 bp y es utilizado en la amplificación, de “un paso”, de WSSV en muestras de camarón procesado/congelado.

- **HPV:** La secuencia del iniciador hacia adelante es 5’ GGT GAT GTG GAG GAG AGA 3’ y hacia atrás es 5’ GTA ACT ATC

GCC GCC AAC 3’. Éste par de iniciadores produce un amplicón de 592 bp.

2.6.4 Protocolo de temperaturas

- **IHHNV:** El ADN extraído y purificado se combina primero con los reactivos y es desnaturado a 94°C por 10 minutos. Enseguida, la muestra es sujeta 39 veces al siguiente ciclo de temperaturas: 94°C por 2 minutos, apareamiento a 55°C por 2 minutos y polimerización a 72°C por 3 minutos. Después del último ciclo, la muestra es polimerizada por 7 minutos a 72°C.
- **WSSV. PCR de dos etapas (“two-step”):**
Primer paso: El ADN extraído y purificado, los iniciadores, el agua destilada y el resto de los reactivos son combinados y desnaturados a 94°C por 4 minutos; esto es seguido por el apareamiento de los iniciadores por 1 minuto a 60°C y finalmente por la polimerización a 72°C por 3 minutos. La muestra es entonces ciclada 39 veces bajo el siguiente protocolo de temperaturas: 94°C por 1 minuto, apareamiento a 60°C por 1 minuto y polimerización a 72°C por 3 minutos. Después del último ciclo, la muestra es polimerizada por 5 minutos a 72°C.

Segundo paso (anidado): Los amplicones de la primera etapa (0.5 µl) son combinados con los el segundo par de iniciadores (anidados), agua destilada y el resto de los reactivos y desnaturados a 95°C por 5 minutos. La muestra es entonces ciclada 39 veces bajo el siguiente protocolo de temperaturas: 95°C por 30 segundos, apareamiento a 60°C por 30 segundos y polimerización a 72°C por 1 minuto. Después de último ciclo, la muestra es polimerizada por 5 minutos a 72°C.

Los parámetros de temperatura para la detección de WSSV por medio de PCR de un sólo paso (por ejemplo, el usado en el caso de camarones congelados) son los mismos que para el segundo paso del PCR anidado.

- **HPV:** La muestra (0.5µl) y los reactivos son mezclados y sujetos a 40 ciclos bajo el siguiente protocolo de temperaturas: desnaturación a 94°C por 1 minuto; apareamiento a 60°C por 1 minuto; y polimerización a 72°C

por 2 minutos. Después del último ciclo, la muestra es polimerizada por 7 minutos adicionales a 72°C y por último se mantiene a 4°C por 5-10 minutos.

2.6.5 Mezcla de reactivos (“Ready to Go Beads”/ “Reactivos Listos para Usarse”)

- **IHHNV:** En el caso de los reactivos listos para usarse “Ready-To-Go Beads®” (Amersham Pharmacia Biotech), los cuales contienen 1.5 unidades de enzima Taq ADN polimerasa, 10 mM Tris-HCL (pH 9.0 a TA), 50 mM KCl, 1.5 Mm MgCl₂ y 200 µM de cada dNTP, la mezcla optimizada de reactivos consiste de 1 µl de ADN extraído y purificado y 50 pmol de cada iniciador. El volumen final de la reacción es de 25 µl.
- **WSSV:** Si se recurre a reactivos listos para usarse “Ready-To-Go Beads®” (Amersham Pharmacia Biotech), los cuales contienen 1.5 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa, 10 mM Tris-HCL (pH 9.0 a TA), 50 mM KCl, 1.5 Mm MgCl₂ y 200 µM de cada dNTP, la mezcla optimizada de reactivos consiste de 1 µl de ADN extraído y purificado y 50 pmol de cada iniciador. El volumen final de la reacción es de 25 µl.
- **HPV:** Utilizando “Ready-To-Go Beads®” (Amersham Pharmacia Biotech), la mezcla optimizada de reactivos consiste de 1 µl de ADN extraído y purificado y 50 pmol de cada iniciador. El volumen final de la reacción es de 25 µl.

2.6.6 Visualización

Como ya se mencionó anteriormente, los productos de la amplificación son sujetos primero a electroforesis en un gel de agarosa y después son visualizados con la ayuda de luz ultravioleta en un transiluminador. Específicamente se utiliza una alícuota de 10µl del producto amplificado y se somete a electroforesis en un gel de agarosa al 1-2% (a menor tamaño del fragmento, mayor la concentración de agarosa) el cual contiene bromuro de etidio (ethidium bromide). Una vez que la electroforesis ha llegado a su término, el gel es colocado en el transiluminador ultravioleta y el tamaño de los amplicones es comparado al de

los controles positivo y negativo. El control positivo puede consistir de tejido infectado con el patógeno en cuestión, el cual ha sido sometido al mismo proceso de extracción de ADN que la muestra. Si no se dispone de tejido infectado, se puede utilizar ADN clonado del virus (el cual debe de contener la secuencia reconocida por los iniciadores). Los controles negativos consisten de ADN extraído de una muestra de camarón SPF (Specific Pathogen Free/Libre de Patógenos Específicos) y de una reacción a la cual se le ha agregado únicamente agua destilada esterilizada (“no template”= No ADN) en lugar de muestra.

2.7 Método de RT-PCR para la detección de patógenos.

2.7.1 Fundamento

Se recurre al método de RT-PCR (Reverse-Transcriptase-PCR/Transcriptasa reversa-PCR) cuando la secuencia que se desea amplificar consiste de ARN en lugar de ADN. La diferencia entre PCR y RT-PCR es que este último incluye un paso preliminar en el cual el RNA es transcrito dando lugar a una secuencia complementaria de ADN (cADN), la cual es subsecuentemente amplificada por medio de PCR.

2.7.2 Preparación de la muestra

El primer paso es la preparación del ARN que se utilizará en el ensayo. Para esto se recurre a un “kit” commercial “*High Pure RNA Tissue Isolation Kit/Kit para el Aislamiento Altamente Purificado de ARN de Tejidos*” (Roche Molecular Biochemical) siguiendo las instrucciones del manufacturador. Se deben de tomar medidas de precaución para evitar la contaminación con ARNasas (enzimas que destruyen el ARN). Dichas precauciones incluyen el uso de guantes, de tubos y puntas de pipetas de polipropileno estériles desechables, y el uso de agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC).

2.7.3 Secuencias de los iniciadores

- **TSV:** La secuencia del iniciador hacia adelante (“forward”) es 5’ TCA ATG AGA GCT TGG TCC 3’ y la del iniciador hacia atrás (“reverse”) 5’ AAG TAG ACA GCC GCG

CTT 3'. Este par de iniciadores produce un amplicón de 213 bp a partir del genoma de TSV.

- **YHV:** La secuencia del iniciador hacia adelante es 5' CAA GAT CTC ACG GCA ACT 3' y la del iniciador hacia atrás es 5' CCG ACG AGA GTG TTA GGA GG 3'. Este par genera un amplicón de 273 bp.

2.7.4 RT-PCR. Protocolo de temperaturas

- **TSV:** Si se recurre a los reactivos listos para usarse "*Ready-To-Go Beads®*" (Amersham Pharmacia Biotech) para RT-PCR, el RNA previamente extraído y purificado es transcrito primero a 42°C por 30 minutos, seguido por una desnaturalización a 95°C por 5 minutos. Las muestras son entonces cicladas por 39 minutos bajo el siguiente protocolo de temperaturas: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos.
- **YHV:** Utilizando los reactivos "*Ready-To-Go Beads®*" (Amersham Pharmacia Biotech) para RT-PCR, el RNA extraído y purificado es transcrito a 42°C por 30 minutos, seguido de 95°C por 5 minutos. Posteriormente, las muestras son cicladas 39 veces de acuerdo al siguiente protocolo: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos.

2.7.5 Mezcla de reactivos RT-PCR (Ready to Go Beads/Reactivos Listos para Usarse)

- **TSV:** Si se recurre a los reactivos listos para usarse "*Ready-To-Go Beads®*" (Amersham Pharmacia Biotech) para RT-PCR, estos contienen 2.0 unidades de enzima Taq ADN Polimerasa, 10 mM Tris-HCl, 60 mM KCl, 1.5 Mm MgCl₂, 200µM de cada dNTP, enzima Transcriptasa Reversa de Moloney Murine Leukemia Virus, inhibidor de ribonucleasas *RNAguard* y estabilizadores incluyendo BSA libre de ARNasas/ADNasas. El volumen final de la reacción es de 50 µl, los cuales incluyen 10.0 µl de ARN extraído de la muestra a analizar.
- **YHV:** Utilizando "*Ready-To-Go Beads®*" (Amersham Pharmacia Biotech) para RT-PCR, el volumen final de la reacción es de 50

µl, los cuales incluyen 10.0 µl de ARN extraído de la muestra a analizar.

2.7.6 Visualización.

El procedimiento para la visualización de los productos del RT-PCR es el mismo que para el de los virus de ADN (ver sección 2.6.6).

2.7.7 Resolución de problemas.

1. Es necesario incluir un control positivo y uno negativo en cada corrida. Los resultados no son válidos si después de la amplificación el control positivo no es visible al correr 10 µl de la reacción en el gel de agarosa. Lo mismo aplica si después de la amplificación el control negativo produce un resultado positivo.
2. Si el problema esta relacionado al control positivo, existen varios escenarios:
 - a) Alguno de los componentes no fue agregado a la reacción.
 - b) La enzima Taq polimerasa no fué agregada o estaba inactivada al momento de usarla.
 - c) El ARN de la muestra estaba degradado, resultando inútil para la amplificación del genoma del virus en cuestión.
3. Si el problema esta relacionado al control negativo es que ha ocurrido contaminación. Para minimizar el peligro de la contaminación, es necesario tomar varias precauciones. Siempre se debe de usar guantes al preparar las reacciones. Se debe de utilizar puntas de pipetas de desplazamiento positivo ("positive displacement") o con barreras para aerosoles. De ser posible, los reactivos deberán ser manejados únicamente en un cuarto limpio, alejado de las áreas en donde se lleve a cabo la preparación de las muestras de tejido. Se debe de asignar un grupo de pipetas únicamente para la preparación de los reactivos y otro grupo de pipetas únicamente para la preparación de las muestras de tejidos. Estas pipetas deberán de asignarse únicamente para trabajo de PCR.
4. Si existe un exceso de citrato de sodio en la muestra, la reacción de amplificación resultará inhibida. Para determinar si una muestra de

hemolinfa es realmente negativa y no el resultado de la inhibición por el citrato de sodio, se puede correr una muestra “cebada”. Por ejemplo, se puede preparar una reacción de la manera usual, la cual contendrá la muestra sospechosa de estar inhibida por el citrato de sodio, y se le agregará 1 µl de una muestra que se sepa es positiva para el virus en cuestión. Si en el gel de agarosa no se observa el producto del tamaño esperado, esta muestra no podrá ser considerada realmente negativa. Será entonces necesario tomar otra muestra, en la cual se utilice menos citrato de sodio.

APÉNDICE

INSTRUCCIONES PARA LA PREPARACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

1. De ser posible envíe únicamente cultivos puros. Para esto, utilice tubos pequeños (lo mejor es que sean de material plástico) ya sea con 1.5 a 2 ml de agar, TSA con NaCl al 2%, agar marino, o medio de Zobell. Siembre haciendo al mismo tiempo una punción en el medio usando el asa de platino. De ser posible envíe cultivos de 18-24 horas. NO CONGELE los cultivos, envíelos a temperatura ambiente. Si lo desea (principalmente si se estima que el transporte pueda tomar más de 10 días), puede agregar un poco de aceite mineral esterilizado para cubrir el cultivo. Para evitar que los recipientes de cultivo se rompan, envuélvalos en material protector y empáquelos en una caja de consistencia fuerte.
2. Si no es posible enviar cultivos puros, inocule tubos de agar de la misma manera que se indicó en el párrafo anterior. El laboratorio que reciba las muestras puede luego intentar el aislamiento. Para este propósito también se pueden enviar cajas de Petri pequeñas, las cuales han sido bien selladas y protegidas. Se debe de evitar el enviar cajas de Petri o tubos de ensayo de vidrio.
3. Postlarvas pequeñas y larvas pueden ser enviadas dentro de pequeños contenedores de plástico con agua de mar a los cuales se les ha agregado un poco de aceite mineral estéril. NO CONGELAR estas muestras.
4. Incluya con el envío un historial de las muestras tomadas especificando:
 - Especie de camarón de que se trate y la edad.
 - Fuente de donde se tomaron las muestras de bacterias (por ejemplo: agua, hemolinfa, tejido de camarón, etc.)
 - Características importantes de las colonias (por ejemplo: luminiscencia, fermentación de la glucosa, etc.)
 - Especificar si se han utilizado antibióticos.
5. En sus solicitud de análisis indique si requiere pruebas para la determinación de sensibilidad a antibióticos.

3 ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

3.1 Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoiética Infecciosa (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus=IHHNV)

3.1.1 Nombre de la enfermedad y del agente etiológico

Necrosis hipodérmica y hematopoiética infecciosa (enfermedad IHHN); síndrome de la deformidad y enanismo ("runt-deformity syndrome" o RDS).

Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoiética infecciosa (IHHNV).

3.1.1.1 Agente

IHHNV es un pequeño parvovirus (diámetro promedio de 22 nm) constituido por una cadena sencilla de ADN.

3.1.1.2 Métodos preferidos actualmente para la detección del patógeno

- Hibridación *in situ* con sondas marcadas con DIG (BS4.5, BA402) u otras sondas igualmente adecuadas aplicadas a:
 - o Muestras histológicas fijadas en solución de Davidson (AFA) o en formalina al 10%.
 - o Muestras histológicas tomadas después de 15 a 30 días de potenciamiento de la enfermedad.
 - o Biopsias de apéndices tomados de camarones sub-adultos o reproductores.
- Hibridación en formato de "Dot blot" con sondas marcadas con DIG (BS4.5, BA402), u otras sondas igualmente adecuadas
- Histología de rutina, con tinción H&E, en especímenes que muestren síntomas de la enfermedad de IHHN.
 - o Aplicado a muestras histológicas fijadas en solución de Davidson (AFA) o en formalina al 10%.
 - o Aplicado a muestras histológicas tomadas después de 15-30 días de potenciamiento de la enfermedad.
- PCR usando hemolinfa u homogenizados de tejido tomados de camarones sospechosos u otro tipo de muestras.

3.1.2 Rango geográfico de distribución y especies afectadas

3.1.2.1 Rango geográfico.

- Ampliamente distribuido en instalaciones de cultivo de las Americas y de Asia incluyendo:
 - o América: sureste de los Estados Unidos, México, América Central, Ecuador, Perú, Brazil y numerosas islas del Caribe
 - o Pacífico Central: Hawai, Guam, Tahití y Nueva Caledonia
 - o Asia e Indo-Pacífico: Singapur, Filipinas, Tailandia, Malasia e Indonesia
- Se presume que IHHN es enzootico en camarones peneidos silvestres del Indo-Pacífico; ha sido detectado también en camarones silvestres del Ecuador, la costa occidental de Panamá y la costa occidental de México.
- Hasta el momento se desconoce si IHHNV está representado por una sola cepa o si existen varias de ellas en distintas regiones geográficas.

3.1.2.2 Especies afectadas.

- Se han observado infecciones naturales en: *Penaeus stylirostris*, *P. vannamei*, *P. occidentalis*, *P. californiensis*, *P. monodon*, *P. semisulcatus* y *P. japonicus*.
- Debido a que otras especies de camarones peneidos (*P. setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus*) han podido ser infectadas en condiciones de laboratorio, es probable que también ocurran infecciones naturales en otras especies.
- Especies tales como *P. indicus* y *P. merguensis* parecen ser refractorias a IHHNV.
- Aparentemente los miembros sobrevivientes de poblaciones que han sido infectadas por IHHNV pueden volverse portadores del virus de por vida y transmitirlo a su progenie y a otras poblaciones por medio de transmisión de tipo vertical y horizontal.

3.1.3 Síntomas clínicos de importancia diagnóstica

3.1.3.1 *P. stylirostris*

IHHN es una enfermedad de tipo agudo que puede ocasionar altas mortalidades en juveniles de esta especie. Larvas y postlarvas infectadas verticalmente no se muestran enfermas sino hasta alcanzar aproximadamente el estadio de PL35 o un poco después. Una vez alcanzada esta edad, es posible observar síntomas externos, los cuales son seguidos por mortalidades masivas. En animales infectados horizontalmente, el período de incubación y la severidad de la infección dependen, hasta cierto punto, del tamaño/edad, siendo los juveniles pequeños los más severamente afectados. Los adultos raramente presentan síntomas de la enfermedad o mortalidades.

Los síntomas externos de la enfermedad no son específicos de IHHN, pero en la etapa aguda de la infección, los juveniles de *P. stylirostris* muestran una marcada reducción en el consumo de alimento lo cual es seguido por cambios en el comportamiento y la apariencia. Durante la fase aguda, se ha observado que los camarones de esta especie nadan lentamente hacia la superficie en donde se quedan completamente quietos, se voltean con el vientre hacia arriba, y luego se hunden lentamente hasta el fondo del tanque. Se ha visto que los camarones que muestran esta conducta pueden hacerlo por horas hasta que se vuelven demasiado débiles para continuar o hasta que son canibalizados por sus congéneres más sanos. En este estadio de la infección, *P. stylirostris* puede llegar a exhibir una coloración blanquecina con manchas de color crema, lo cual le da al camarón una apariencia moteada (ver las figuras adjuntas). Este patrón moteado no es definitivo y tiende a desaparecer un poco más adelante. También se ha observado frecuentemente que en *P. stylirostris* y en *P. monodon* infectados por IHHNV se tiende a adquirir una coloración azulosa bastante distintiva y una opacidad de la musculatura abdominal.

Si la enfermedad progresa hasta alcanzar una fase crónica, *P. stylirostris* también

puede sufrir de lo que se conoce como síndrome de las deformaciones y el enanismo (“RDS”; ver Sección 3.1.3.2).

3.1.3.2 *P. vannamei*

En esta especie, IHHN es típicamente una enfermedad de tipo crónico. El síndrome de las deformidades y el enanismo (“Runt Deformity Syndrome” o RDS) que afecta a esta especie ha sido ligado a IHHNV. Típicamente, los juveniles afectados por RDS exhiben rostrums doblados o deformes, antenas arrugadas, caparazón áspero o rugoso, y otras deformidades (ver figuras adjuntas). Las poblaciones de juveniles con RDS exhiben típicamente una distribución de tallas relativamente amplia con una proporción de tallas pequeñas (enanias) mucho mayor de lo normal. El coeficiente de variación (CV=La desviación estándar dividida entre el promedio de diferentes grupos de tallas dentro de una población dada) de una población con RDS es típicamente mayor de 30% y puede incluso llegar al 50%, mientras que en poblaciones de juveniles de *P. vannamei* libres de IHHNV (y por lo tanto sin RDS) los CVs son de entre 10% y 30%.

3.1.4 Procedimientos de diagnóstico en casos de enfermedad

3.1.4.1 Diagnóstico presuntivo

- Presencia de síntomas clínicos.
- Historial de las instalaciones de cultivo, de las especies cultivadas, o de la región, que indique la posibilidad de infección por IHHNV.

3.1.4.2 Métodos para la detección y el diagnóstico definitivo del virus

A través de los siguientes métodos es posible alcanzar un diagnóstico definitivo tanto a nivel individual como a nivel de poblaciones:

- Histopatología directa.
- Potenciamiento seguido por histopatología o pruebas de hibridación *in situ*.

- Bioensayos utilizando *P. stylirostris* libre de patógenos específicos (“Specific Pathogen Free”/SPF) como la especie indicadora.
- Pruebas con sondas genéticas (disponibles en forma de “kit” a través de Diag-Xotics, Inc.), u otras sondas adecuadas en los siguientes formatos:
 - o Hibridación en “Dot-Blot”.
 - o Hibridación "in situ" (histología).
- PCR (ver Sección 2.6) también puede ser utilizado para la detección del virus en muestras de hemolinfa o de tejidos tomadas de camarones sospechosos.

3.1.4.2.1 Método de histopatología directa para la detección de IHHNV

Se basa en la demostración histológica de cuerpos de inclusión intranucleares tipo Cowdry A (CAIs), bastante prominentes, eosinofílicos (en preparaciones de especímenes fijados con soluciones que contengan ácido acético, tales como la solución de Davidson AFA y la solución de Bouin, y que han sido teñidas con H&E), los cuales a su vez están rodeados de un anillo de cromatina dentro de núcleos hipertrofiados en células de tejidos de origen ectodérmico (branquias, epidermis, epitelio hipodermal de la parte anterior y posterior del tracto digestivo, cordón nervioso ventral y ganglios asociados) y mesodérmico (órganos hematopoiéticos, glándula antenal, gónadas, órgano linfóide, tejido conectivo y músculo estriado) (ver Tabla 3.1.1 y figuras adjuntas).

Cuando son teñidos con el método de Feulgen, estos cuerpos de inclusión son de coloración variable dependiendo del estado de virogénesis y de la cantidad de ADN presente. Por lo tanto, los CAIs en desarrollo pueden ser Feulgen negativos, mientras que aquellos que han alcanzado la madurez mostrarán una reacción positiva a la reacción. Durante los estadios larvales de misis o de postlarva temprana, es posible encontrar CAIs dentro de las células del epitelio del intestino. Es posible encontrar cuerpos de inclusión CAIs dentro de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas,

pero esto ocurre muy raramente y es por lo general acompañado de infecciones severas de grado G4 en otros de los tejidos ya mencionados.

3.1.4.2.1.1 Grado de severidad de la infección por IHHNV.

Típicamente los grados de severidad de la infección por IHHNV son reportados en una escala de 0 a 4. El método utilizado para asignar el grado de severidad a un tipo dado de tejido es definido en la Tabla 3.1.2. El cálculo del grado promedio de severidad para el animal completo puede hacerse sumando los grados de severidad estimados para cada tejido, dividiendo luego este valor entre el número de tejidos examinados. Si se requiere, se puede entonces calcular un promedio de la severidad de la infección en la muestra sumando los valores promedio de cada camarón entre el número de animales examinados (cuando se reporte el promedio de la infección de esta manera, siempre deberá de incluirse el rango de severidades encontrado).

3.1.4.2.2 Pruebas de hibridación con sondas genéticas específicas para IHHNV.

3.1.4.2.2.1 Hibridación tipo “Dot blot” usando sondas genéticas no radioactivas marcadas con DIG.

En el procedimiento tipo “Dot-blot” para el diagnóstico de IHHNV, las muestras de tejido homogenizado son inmovilizadas por adsorción en una membrana de nitrocelulosa o nylon y luego hibridadas con sondas genéticas de ADN (por ejemplo la sonda BS4.5 u otras específicas para IHHNV) marcadas con DIG (digoxygenin-11-dUTP). Después de la hibridación y de la reacción de revelado, las muestras de tejido positivas se observan marcadas por la presencia de un precipitado de color azul-negro o púrpura, el cual varía en intensidad dependiendo de la concentración del virus en la muestra (ver figuras adjuntas).

La presencia de manchas de color rosado o salmón, son debidas a la

reacción no específica de la sonda con componentes desconocidos en el tejido del camarón. Para evitar confusión en la interpretación de los resultados de esta prueba, se deberán de incluir siempre los controles apropiados. Tales controles son los siguientes: tejido de camarón SPF (control negativo); tejido de camarón IHHNV positivo (control positivo); y un grupo de muestras cuya condición IHHNV sea desconocida así como un control negativo, y uno positivo los cuales serán sujetos a una prueba de hibridación sin sonda, únicamente expuestos al anticuerpo y al substrato de revelado.

3.1.4.2.2 Hibridación *in situ*.

La prueba de hibridación *in situ* para la detección de IHHNV (en cualquier fase de la infección) puede aplicarse sin ningún problema a especímenes de camarón fijados en formalina o solución de Davidson (AFA) y embebidos en parafina. Por medio de esta prueba, es posible observar la formación de un precipitado azul-negro o púrpura en cualquier lugar del cuerpo del camarón en donde el ADN del virus IHHN (y presumiblemente mRNA) se encuentre presente (ver figuras adjuntas).

En una prueba típica de hibridación *in situ*, las células con CAIs, muestran una intensa reacción nuclear a la sonda, especialmente en la cromatina marginada o en la superficie interna de la membrana nuclear. Mediante esta prueba se ha demostrado con frecuencia, que los núcleos picnóticos y núcleos de células aparentemente normales también pueden contener ácidos nucleicos de IHHNV.

Muchas células positivas para IHHNV también muestran densas acumulaciones citoplasmáticas del virus. De la misma manera, se puede observar con frecuencia una reacción positiva a la sonda asociada a los fragmentos de células necróticas, en el debris extracelular y en el contenido de los fagolisosomas de los fagocitos del corazón, branquias y otros tejidos.

Comúnmente, la porción acelular de la cutícula del camarón (infectado por IHHNV o no) toma una coloración azul

debido a la reacción no específica de la sonda. Esta coloración azul es debida a la presencia de la quitina, un polímero complejo de n-acetilglucosamina, el cual se adhiere (tal vez electrostáticamente) al ADN de la sonda.

3.1.4.3 Procedimientos no letales para el análisis de reproductores

Animales reproductores de las especies *P. vannamei*, *P. stylirostris* y *P. monodon* pueden ser examinados individualmente para determinar la presencia de IHHNV por medio de una biopsia no letal.

3.1.4.3.1 Muestra

La muestra consiste de un apéndice, tal como el segundo o tercer pleópodo, un proceso branquial, o uno de los maxilípedos. Después de obtener el apéndice, este debe de ser preservado ya sea por congelación, en solución de Davidson o en alcohol etílico al 95% y finalmente procesado de acuerdo al método de diagnóstico de preferencia.

Las muestras de hemolinfa deben de ser tomadas de acuerdo a las instrucciones ya mencionadas en la sección 2 de este manual y procesadas ya sea inmediatamente o preservadas por congelación o fijación en alcohol al 95% y subsecuentemente procesadas.

3.1.4.3.2 Pruebas de diagnóstico

Dos de las pruebas más apropiadas para examinar este tipo de biopsias son PCR e hibridación *in situ* con la sonda genética BS4.5 específica para IHHNV (u otras sondas para IHHNV). Aunque menos sensitivos, la hibridación en formato “Dot blot” y la histología de rutina con tinción de H&E también pueden utilizarse para analizar este tipo de muestras.

3.1.4.3.2.1 Histología de rutina

El diagnóstico de esta enfermedad está basado en la presencia de inclusiones intranucleares patognomónicas (CAI). El corte histológico del apéndice es hecho en el plano longitudinal medio para de esta manera proveer una panorámica tan amplia como sea posible de los tejidos presentes (epidermis, subcutis, y fibras

nerviosas). El corte resultante es examinado para determinar la presencia de inclusiones intranucleares tipo CAI (las cuales aparecen como cuerpos elongados en las células de las fibras nerviosas). Mediante esta técnica es posible detectar muchos de los animales infectados en una población dada, sin embargo, se desconoce la sensibilidad del procedimiento y por lo tanto no es recomendable para certificar la condición SPF de una población.

3.1.4.3.2.2 Métodos de diagnóstico con sondas genéticas.

- Hibridación *in situ*
- Hibridación en formato “Dot blot”

3.1.4.3.2.2.1 Hibridación *in situ*

Utilice cortes en parafina de muestras que hayan sido fijadas ya sea en solución de Davidson o en formalina. Para los detalles del procedimiento de hibridación *in situ* favor de referirse a la sección 2. El diagnóstico positivo de IHHNV se basa en la demostración de ácidos nucleicos de IHHNV en las células blanco (ya sea en el citoplasma o en el núcleo), lo cual es indicado por la presencia de un precipitado azul-negro o púrpura (ver Figuras No. 7 y 8).

3.1.4.3.2.2.2 Hibridación en formato “Dot blot”:

Utilice ya sea apéndices frescos, congelados o fijados en alcohol. Para los detalles del método favor de referirse a la sección 2. El diagnóstico positivo de IHHNV se basa en la presencia de un precipitado azul-negro o púrpura en el lugar de la membrana en donde se inmovilizó la muestra. La intensidad del color del precipitado depende de la concentración de ácidos nucleicos virales en la muestra (ver figuras adjuntas).

3.1.4.3.2.2.3 Método de PCR:

Utilizando los iniciadores apropiados (ver sección 2.6), este método puede aplicarse a muestras de tejido (apéndices) o de hemolinfa ya sean frescas, congeladas o fijadas en alcohol.

Tabla 3.1.1. Lista de tejidos que con mayor frecuencia son blanco de la infección por IHNV. Para poder calcular un índice promedio de severidad de la infección, todos estos tejidos deben de ser examinados y la severidad de la infección en cada uno de ellos estimada.

TEJIDO/ÓRGANO	SITIOS MÁS ADECUADOS PARA BUSCAR LESIONES CAUSADAS POR IHNV
Filamentos branquiales y mastigobranquias	Epitelio cuticular y tejidos de soporte
Cordón nervioso	Segmentos de cordón nervioso ventral que conectan a los gánglios nerviosos o bien segmentos de cordón nervioso periferales que inervan a los apéndices.
Gánglios nerviosos	Células de soporte presentes en los gánglios nerviosos de los ojos y del cordón nervioso ventral.
Nódulos hematopoiéticos epigástricos	Nódulos hematopoiéticos presentes a lo largo de la aorta dorsal anterior.
Nódulos hematopoiéticos de los maxilípedos	Nódulos hematopoiéticos presentes en la base del segundo y tercer maxilípedo.
Glándula antenal	Células epiteliales de los túbulos.
Epidermis	Epitelio cuticular (especialmente en aquellas áreas que sufren menos distorsión al hacer los cortes histológicos, tales como los dobleces de la cutícula en la región posterior al corazón, la parte inferior del caparazón en la cámara branquial y cerca de la base de los apéndices bucales y de los pereiópodos).
Cavidad gastrointestinal	Epitelio cuticular y tejido conectivo subcuticular.
Corazón	Tejido conectivo que rodea al corazón (pericardio).
Órgano linfoide	Tejido parenquimal y conectivo.

Tabla 3.1.2 Método para estimar individualmente y con mayor exactitud el grado de severidad de infección por IHNV en tejidos blanco.

Grado	Número aproximado de CAIs/Campo(s)*	Conclusión/Prognosis
0	Ninguno observado	Infección no detectada
1	1-5 / 200	Infectado / variable
2	1-2 / 20	Infectado / variable
3	1-5 / 2	Infectado / enfermedad aguda
4	>10 por campo	Infectado / generalmente letal

* Número estimado de inclusiones diagnósticas de tipo Cowdry A (CAI) observadas a 40X por cada campo visual.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

IHHNV



Figura 1. Especímenes de *P. stylirostris* durante la fase aguda de la enfermedad causada por IHHNV. Nótese el patrón anormal de coloración en los segmentos abdominales impartiendo al camarón una apariencia bandeada o moteada. Tanto el camarón en la esquina superior izquierda (solamente se observan los pleópodos) como el de la esquina inferior derecha (solamente se observa la cabeza), se encontraban extremadamente letárgicos (postrados de lado) y posiblemente moribundos.

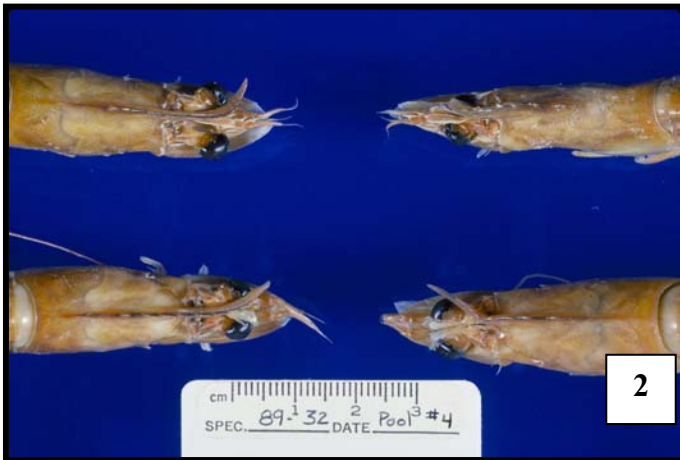


Figura 2. Se muestran varios ejemplos de rostrums deformados en *P. vannamei* con IHHNV en fase crónica (síndrome de las deformaciones y el enanismo). El rostrum puede llegar a mostrar desviaciones prácticamente en cualquier dirección.



Figura 3. Ejemplos adicionales de deformaciones corporales en *P. vannamei* a consecuencia de la enfermedad causada por IHHNV (síndrome de las deformaciones y el enanismo). Nótese la deformación del sexto segmento abdominal en 3 de los 4 camarones que se muestran.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

IHHNV

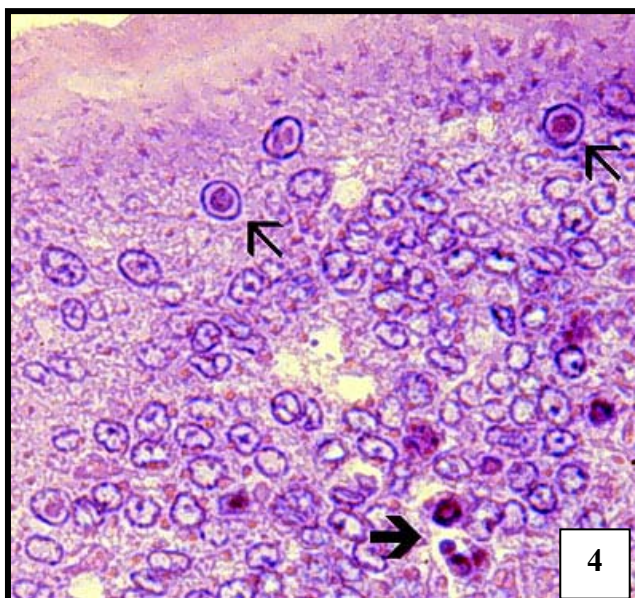


Figura 4. Fotomicrografía a bajo aumento de un corte histológico de un juvenil de *P. stylirostris* en la etapa aguda de la enfermedad causada por IHHNV (G4=grado severo). La preparación muestra un corte hecho a través del epitelio cuticular y el tejido conectivo subcuticular, en la parte dorsal del cuerpo, justo posterior al corazón. Se pueden observar numerosas células necróticas con núcleos picnóticos o con cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos de tipo patognomónico (inclusiones de Cowdry tipo A o CAI). Las flechas señalan algunos ejemplos. Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 830X.

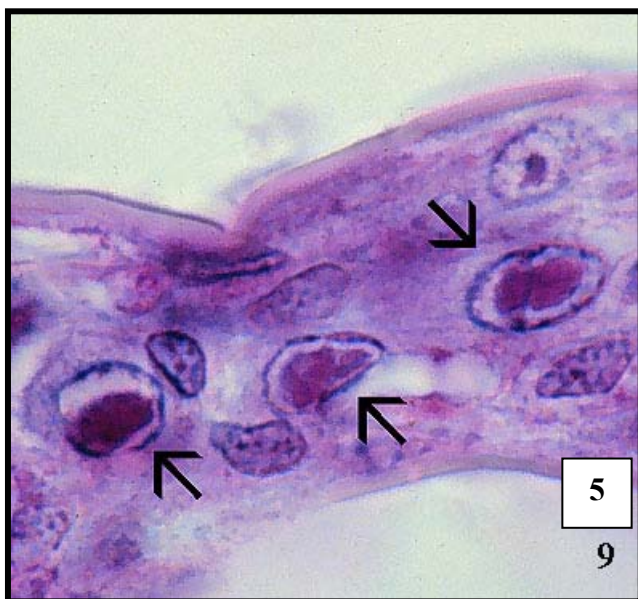


Figura 5. Fotomicrografía de una lamela branquial mostrando tres células adyacentes con cuerpos de inclusión intranuclear de IHHNV tipo CAI, dentro de los núcleos hipertrofiados (varios ejemplos marcados por las flechas). Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 1,800X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

IHHNV

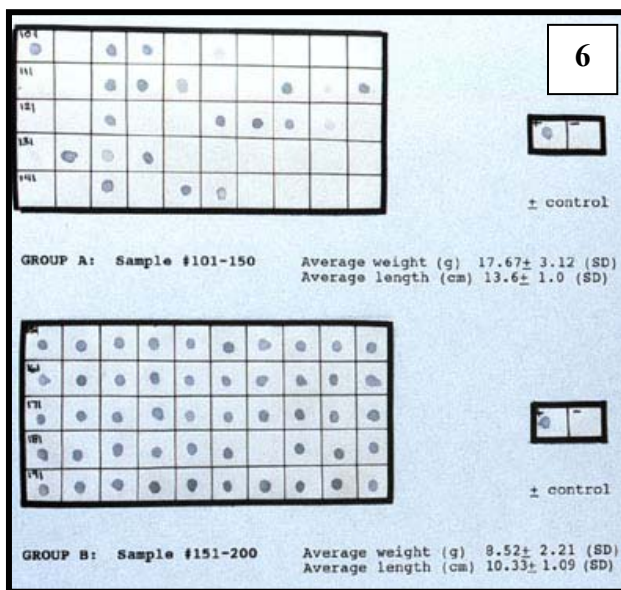


Figura 6. Resultados de una prueba de hibridación en formato de punto-mancha (“Dot-blot”) para IHHNV. Se utilizó una sonda de ADN, marcada con DIG, específica para la detección de IHHNV. Las muestras de hemolinfa positivas presentan la deposición de un precipitado de color azul o púrpura, mientras que las muestras negativas no muestran precipitado alguno.

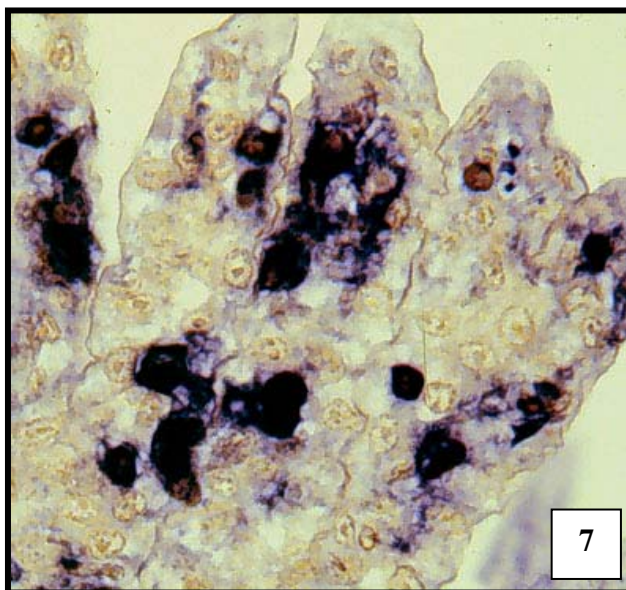


Figura 7. Resultados de una prueba de hibridación *in situ* para IHHNV. Se utilizó una sonda de ADN, marcada con DIG, específica para la detección de IHHNV. Corte medio-sagital de un juvenil de *P. vannamei* con síndrome RDS (RDS=“Runt deformity syndrome” o Síndrome de las deformaciones y el enanismo). Se puede observar una reacción positiva de la sonda en varios CAIs y restos celulares así como también en la hemolinfa. Tinción: Bismarck Brown y sonda genética marcada con DIG. Magnificación: 600X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

IHHNV

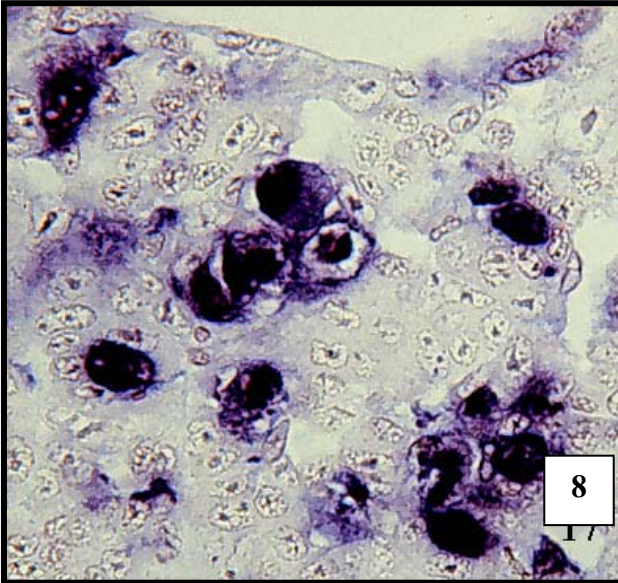


Figura 8. Resultados de una prueba de hibridación *in situ* para IHHNV. Se utilizó una sonda de ADN, marcada con DIG, específica para la detección de IHHNV. Corte a través del tejido hematopoiético de un juvenil *P. stylirostris* con infección severa (G4) por IHHNV. Se puede observar una abundancia de células con reacción positiva a la sonda. Tinción: Bismarck Brown y sonda genética marcada con DIG. Magnificación: 700X.

3.2 **Parvovirus Hepatopancreático (HPV)**

3.2.1 Nombre del agente etiológico y de la enfermedad.

Parvovirus hepatopancreático (HPV). Enfermedad de HPV.

3.2.1.1 Agente

HPV es un parvovirus pequeño (22 a 24 nm de diámetro) con un genoma constituido por ADN de una sola cadena.

Debido a la manera de replicarse, al tamaño del virión y al tipo de inclusiones intranucleares que se tiñen fuertemente con la reacción de Feulgen (confirmando el contenido de ADN del genoma), HPV es considerado como miembro de la familia Parvoviridae.

3.2.1.2 Métodos preferidos actualmente para el diagnóstico:

- Métodos histológicos de rutina.
- Métodos rápidos de campo con colorante Giemsa para la tinción de improntas de hepatopáncreas.
- Hibridación *in situ* usando sondas genéticas específicas para HPV como por ejemplo la sonda S-2.0.

3.2.2 Rango geográfico de distribución y especies afectadas

3.2.2.1 Rango geográfico

HPV ha sido observado en Australia tanto en camarones silvestres como cultivados y en camarones cultivados en China en el área del Mar Amarillo, Korea, Taiwan, Filipinas, Indonesia, Malasia, Singapore, Kenya, Kuwait e Israel.

En un principio, debido a que HPV fue descubierto en Asia y a que todos los reportes iniciales de camarones con infecciones de HPV se originaban ahí mismo o en la región del Indopacífico, se llegó a considerar que HPV era un virus exclusivamente de camarones peneidos de Asia, Africa y Australia. Sin embargo, a principios de 1987, HPV fue detectado en camarones peneidos asiáticos que habían sido importados para su cultivo a re-giones de América del Sur y

también en *Penaeus vannamei* en varias localidades de América del Norte y del Sur. Subsecuentemente, a partir de 1990, HPV fue detectado cada año a lo largo de la costa del Pacífico mexicano en poblaciones indígenas de *P. vannamei* y *P. stylirostris* y en la costa de El Salvador en poblaciones silvestres de *P. vannamei*. Estos hallazgos sugieren que HPV puede haber alcanzado ya una distribución cosmopolita.

3.2.2.2 Especies afectadas

Se han observado infecciones naturales en las siguientes especies: *Penaeus merguensis*, *P. semisulcatus*, *P. chinensis* (=orientalis), *P. esculentus*, *P. monodon*, *P. japonicus*, *P. penicillatus*, *P. vannamei*, and *P. stylirostris*. Un tipo de HPV (o un agente muy similar no relacionado al HPV de camarones peneidos) también ha sido observado en *Macrobrachium rosenbergii*.

La transmisión experimental no ha sido consistentemente exitosa.

3.2.3 Síntomas clínicos de importancia diagnóstica

Los síntomas externos de la enfermedad no son específicos de HPV. Sin embargo, en casos en los que la infección es severa es posible observar atrofia y decoloración del hepatopáncreas, reducción en la tasa de crecimiento, anorexia, reducción en la actividad de limpieza dando como resultado un incremento en el ensuciamiento de branquias y apéndices ocasionado por la colonización con organismos epicomensales, opacidad ocasional de los músculos abdominales e infecciones secundarias por patógenos tales como *Vibrio* spp.

Las mortandades ocasionadas por HPV son difíciles de documentar ya que es un virus que raramente se presenta solo durante las epizootias. Sin embargo, las tasas de mortalidad reportadas durante estas epizootias con múltiples agentes patógenos pueden ser bastante altas en los estadios juveniles tempranos. En estos casos, se han documentado mortandades acumuladas del 50 al 100% a las 4 semanas de haberse detectado el problema.

3.2.4 Procedimientos de diagnóstico en casos de enfermedad

3.2.4.1 Diagnóstico presuntivo

- La presencia de síntomas clínicos tales como los descritos en la sección 3.2.3.
- Un historial de las instalaciones, de la región, y/o de la o las especies cultivadas, que indique la probabilidad de infección por HPV (por ejemplo la introducción de peneidos derivados de regiones asiáticas o de otros lugares en donde HPV sea prevalente).

3.2.4.2 Métodos para la detección y el diagnóstico definitivo del virus

Para llegar a un diagnóstico definitivo se pueden utilizar cualquiera de los siguientes métodos:

3.2.4.2.1 Método histológico de rutina

El diagnóstico histológico de la enfermedad causada por HPV se basa en la demostración de cuerpos de inclusión intranucleares, generalmente individuales, basofílicos (con tinción de H&E) y con reacción positiva a la tinción de Feulgen. Dichos cuerpos de inclusión se presentan dentro de núcleos hipertrofiados en células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas (ver las figuras adjuntas). Otra característica citopática distintiva es el desplazamiento lateral y compresión del nucleolo, el cual incrementa en tamaño y se mantiene íntimamente asociado al cuerpo de inclusión en desarrollo. La marginación de la cromatina es también otra característica prominente de los núcleos infectados con HPV (ver las figuras adjuntas).

Al inicio de su formación, los cuerpos de inclusión de HPV tienen la forma de pequeños cuerpos eosinofílicos los cuales se encuentran localizados en la parte central del núcleo, muy cerca del nucleolo. Más adelante, durante el proceso de virogénesis, el cuerpo de inclusión se vuelve intensamente basofílico (ver las figuras adjuntas). Las células que con mayor frecuencia se ven afectadas por este virus se encuentran en la porción distal de los túbulos del hepatopáncreas, en células epiteliales de tipo E o F.

3.2.4.2.2 Método rápido de campo para la tinción de improntas de hepatopáncreas utilizando la técnica de Giemsa

La sensibilidad diagnóstica de la técnica de Giemsa para la tinción de improntas de hepatopáncreas es muy cercana a la alcanzada por medio de histología (de 60% a 100% de sensibilidad diagnóstica comparada a la de histología, para ejemplos ver las figuras adjuntas). La equivalencia entre la sensibilidad diagnóstica del método de Giemsa y la de la histología resulta mejor cuando tanto la prevalencia como la severidad de la infección de HPV son altas, pero resulta inferior cuando estos valores son bajos (tan sólo un 50% o menos de sensibilidad diagnóstica si la severidad de la infección o la prevalencia son bajas). La principal aplicación del método es en situaciones de campo (por ejemplo, granjas o laboratorios con limitaciones de equipo) o en situaciones en las que se requiere de un diagnóstico rápido.

- Seleccione post-larvas o juveniles vivos de entre la población que será evaluada para determinar la presencia de HPV.
- Para llevar a cabo la disección, coloque el espécimen vivo en una superficie limpia, haga un corte que separe el cefalotórax del abdomen a la altura del primer segmento abdominal y rápidamente extraiga el hepatopáncreas.
- Bisecte el hepatopáncreas rápidamente y toque varias veces la parte expuesta del órgano (impronta) en la superficie limpia de un portaobjetos de vidrio.
- Las improntas deben de ser preparadas tan rápido como sea posible para evitar que la autólisis del hepatopáncreas destruya las células a analizar.
- Fije las improntas por inmersión en metanol por 6 minutos y déjelas secar al aire libre antes de llevar a cabo la tinción o el almacenamiento.
- Tiña las improntas utilizando el método de Giemsa de Wolbach (ver la sección 3.2.4.2.2.1) o el método Diff-Quik®.
- Las células infectadas por HPV muestran características morfológicas idénticas a

aquellas observadas por medio de histología convencional (ver la sección 3.2.4.2.1). Los cuerpos de inclusión tempranos de HPV se observan como pequeñas inclusiones eosinofílicas asociadas al nucleolo. Los cuerpos de inclusión maduros son de tamaño mayor (causando hipertrofia del núcleo), de apariencia basofílica y asociados al nucleolo hipertrofiado (ver las figuras adjuntas).

- Vale la pena mencionar que con esta técnica los hepatopáncreas con los grados más altos de severidad de infección también tienden a mostrar el menor número de células destruidas (debido a la autólisis de este órgano) y también tienden a mostrar el mayor número de células intactas (infectadas y no infectadas). Este fenómeno tal vez sea debido a que los hepatopáncreas infectados por HPV tienden a presentar un número menor de células completamente funcionales.

NOTA: El estuche de tinción Diff-Quik® es un producto comercial disponible comercialmente. Para adquirirlo se puede contactar a la compañía Baxter Healthcare Corporation, Scientific Products Division, McGaw Park, Illinois.

3.2.4.2.2.1 Procedimiento de tinción de improntas de hepatopáncreas utilizando el método de Giemsa (Wolbach) para el diagnóstico de HPV (modificado a partir del protocolo original de Luna, 1968):

Solución Giemsa-Wolbach de trabajo

Solución de Giemsa	1.25 ml
Metanol	1.5 ml
Carbonato de sodio	0.5% (2 gotas)
H ₂ O destilada	50 ml

Solución madre (“stock”) de Rosin alcoholico

Rosin blanco	10 gr
Alcohol absoluto	100 ml

Solución Rosin de trabajo:

Rosin blanco (“stock”)	5.0 ml
95% etanol	40 ml

PROCEDIMIENTO:

1. Fijar la preparación sumergiendola en metanol por 6 minutos. Secar al aire libre.
2. Teñir con solución Giemsa por 30 minutos a 60°C o bien durante toda la noche a temperatura ambiente. Se debe utilizar únicamente solución Giemsa recién preparada y desechar aquella que ha sido usada.
3. Diferenciar usando la solución de trabajo de rosin alcoholico hasta que la impronta adquiera una coloración rosada-púrpura. Revisar los resultados utilizando un microscopio compuesto.
4. Deshidratar en alcohol absoluto, aclarar con xileno o Hemo De (substituto de xileno), dos cambios de cada uno.
5. Montar con Permount.

RESULTADOS:

Cromatina nuclear – azul.
 Cuerpos de inclusión intranucleares de HPV – de azul a púrpura oscuro.
 Colágeno y otros componentes de tejidos - rosado
 Rickettsia – púrpura
 Bacteria – azul

3.2.4.2.3 Diagnóstico de HPV usando sondas genéticas

Las sondas genéticas A-1.9 y S-2.0, marcadas con DIG y específicas para la detección de HPV, son consideradas como una herramienta extremadamente sensitiva para la detección de HPV.

- Punto-mancha (“Dot blots”). La presencia de enzimas endógenas dentro del hepatopáncreas limita el uso de la hibridación en formato de punto-mancha cuando se utilizan homogenizados de este órgano.
- Hibridación *in situ*. La hibridación *in situ* con la sonda genética S-2.0 representa una manera de detectar HPV con una sensibilidad extremadamente alta (ver figuras adjuntas).
 - Las sondas genéticas A-1.9 y S-2.0 reaccionan con la mayoría de

las cepas de HPV de Asia, África, Australia y el continente Americano.

- Las sondas A-1.9 y S-2.0 no reaccionan con el tipo de HPV presente en *Macrobrachium rosenbergii* de Malasia.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

HPV

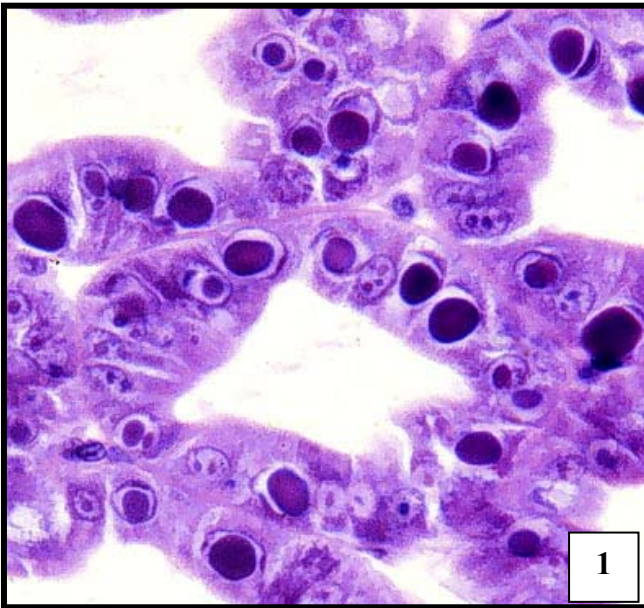


Figura 1. Corte histológico de un juvenil *P. esculentus* con infección avanzada de HPV. Se pueden observar numerosos cuerpos de inclusión basofílicos dentro de los núcleos de células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas. Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 700X.

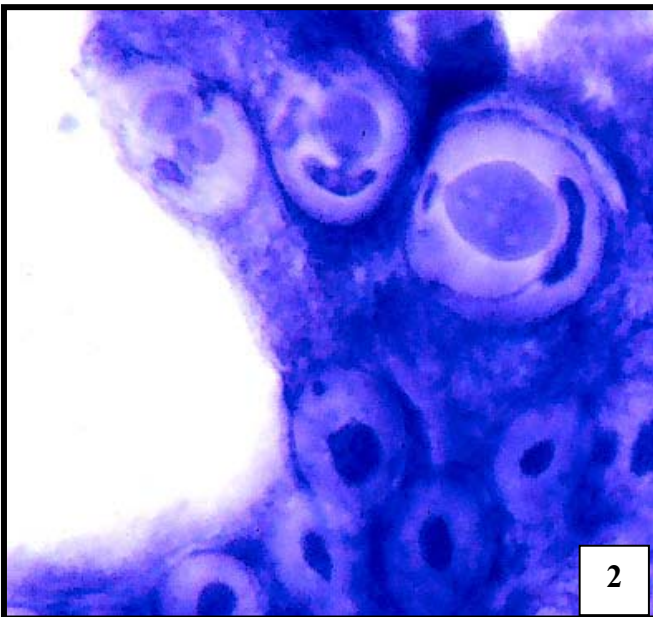


Figura 2. Impronta de tejido del hepatopáncreas mostrando racimos de células infectadas por HPV y células normales. Las tres células vecinas en la porción superior de la fotografía están infectadas y muestran cuerpos de inclusión en diferentes etapas de madurez. Las seis células en la porción inferior se muestran aparentemente normales. Tinción: Método rápido de campo con colorante Giemsa de Wolbach. Magnificación: 2,600X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

HPV

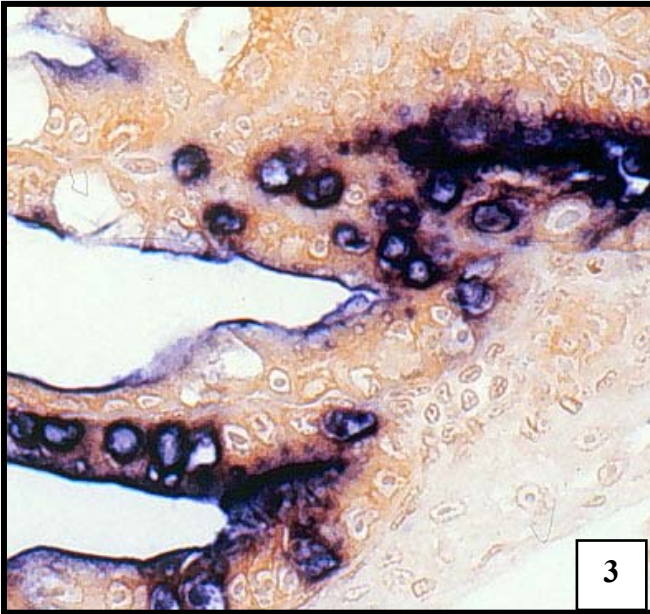


Figura 3. Resultados de una prueba de hibridación *in situ* para HPV utilizando una sonda de ADN, marcada con DIG, específica para la detección de este virus. La presencia de un precipitado azul oscuro o negro indica una reacción positiva de la sonda y por lo tanto la presencia del virus. Entre los sitios con una señal positiva a la sonda se encuentran: cuerpos de inclusión intranucleares, porciones de cromatina perinuclear y partículas virales de HPV (presuntamente liberadas por células necróticas o lisadas) adheridas a las microvellosidades de los hepatocitos. Tinción: Bismarck Brown y sonda genética marcada con DIG. Magnificación: 100X.



Figura 4. Porción amplificada de la Figura 3 mostrando la reacción positiva de la sonda (precipitado azul oscuro a negro) dentro de dos células infectadas. La reacción de la sonda se encuentra concentrada dentro de los núcleos, principalmente en los cuerpos de inclusión de HPV. Tinción: Bismarck Brown y sonda genética. Magnificación: 16, 000X.

3.3 Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)

3.3.1 Nombre del agente etiológico y de la enfermedad.

En la literatura (principalmente la referente los primeros reportes de esta enfermedad) se hace mención a por lo menos tres “virus” dentro del complejo del síndrome de la mancha blanca (WSS) o “Virus de la China”. Hoy en día se sabe que todos son en realidad muy similares y que probablemente se trata del mismo agente. Estos son:

- HHNBV = “Hypodermal & hematopoietic necrosis baculovirus” (baculovirus de la necrosis hematopoiética e hipodérmica); SEED= “Shrimp Explosive Epidermic Disease” (enfermedad explosiva de la epidermis del camarón); “China virus disease” (enfermedad del virus de la China).
- RV-PJ = “Rod-shaped nuclear virus of *Penaeus japonicus*” (virus intranuclear cilíndrico de *Penaeus japonicus*).
- SEMBV = “Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus” (baculovirus sistémico del ectodermo y del mesodermo); enfermedad roja; enfermedad de las manchas blancas.
- WSBV = “White spot baculovirus” (baculovirus de la mancha blanca); síndrome de la mancha blanca; enfermedad de la mancha blanca.

Hoy en día también se sabe que no se trata realmente de un baculovirus sino de un virus completamente diferente, con características propias y para el cual probablemente será necesario un nuevo taxón. Para ésto se ha propuesto la creación de una nueva familia que llevaría el nombre de familia *Nimaviridae*.

WSSV es un virus de doble cadena de ADN, presenta forma elíptica a cilíndrica, membrana trilaminar y los viriones tienen un tamaño de 80-120 x 250-380 nm. En preparaciones teñidas negativamente, es posible observar la presencia de un apéndice o “cola”. El genoma tiene un tamaño aproximado de 290 kbp, lo cual lo hace uno de los virus más complejos que infectan al camarón.

3.3.1.1 Métodos preferidos actualmente para el diagnóstico:

- Métodos histológicos de rutina con tinción de hematoxilina/eosina (H&E).
- Método rápido de campo para la tinción de improntas.
- Hibridación *in situ* con sondas genéticas específicas.
- Hibridación en formato “dot blot” con sondas genéticas específicas.
- Aplicación de anticuerpos monoclonales (Mabs) para la detección de WSSV en formato de “Immunosquash” o en cortes de parafina.
- PCR con pares de iniciadores específicos para la detección de WSSV.

3.3.2 Rango geográfico de distribución y especies afectadas

3.3.2.1 Rango geográfico.

El virus del síndrome de la mancha blanca ha sido reportado en las regiones geográficas mencionadas más abajo. Sin embargo, debido a que la industria depende mucho del transporte regional e internacional de camarón vivo, es muy posible que la distribución de éste y otros virus sea mayor que lo indicado y probablemente en expansión.

- HHNBV - China.
- RV-PJ - Japón, China y Korea.
- SEMBV - Tailandia.
- WSBV - Indonesia, Taiwan, Vietnam, Malasia, India y Texas (U.S.).

Después de su aparición en 1992-1993 en el noroeste de Asia, este virus se ha dispersado rápidamente a través de la mayoría de las regiones camaronícolas de Asia y del Indo Pacífico.

En noviembre de 1995, ocurrió el primer caso confirmado de WSSV en el hemisferio occidental. En este caso, se trataba de camarones cultivados (*P. setiferus*) en una granja del sur del estado de Texas. En la vecindad de la granja afectada se encontraba una planta procesadora de camarón, la cual se sospecha pudo haber sido el foco de la infección, ya que era uno de los mayores importadores y reprocesadores de camarón proveniente de zonas afectadas por WSSV en Asia.

Más adelante, a finales del año 1999, ocurrió el primer caso confirmado de WSSV en América Central. Hoy en día, la enfermedad se ha dispersado a México, Nicaragua, Honduras, Costa Rica, Panamá, Ecuador y Colombia.

3.3.2.2 Especies afectadas

3.3.2.2.1 Infecciones naturales

Se han observado infecciones naturales en las siguientes especies: *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. chinensis* (=orientalis), *P. indicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*(?).

3.3.2.2.2 Infecciones experimentales

En estudios de laboratorio, una cepa de virus originaria de Tailandia resultó altamente patógena para las siguientes especies: *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, and *P. setiferus*.

No se ha observado resistencia significativa en ninguna de las especies de camarones peneidos.

3.3.3 Síntomas clínicos de importancia diagnóstica

- Se ha reportado que durante la fase aguda de la enfermedad, los camarones tienden a mostrar una reducción en el consumo de alimento, se vuelven letárgicos, la cutícula se desprende fácilmente y presenta manchas blancas (de ahí el nombre dado a la enfermedad) de aproximadamente 0.5 a 2.0 mm de diámetro, las cuales son más conspicuas en la parte interna del caparazón. Es posible que las manchas blancas representen depósitos anormales de sales de calcio en el epitelio cuticular.
- En muchos casos, como sucede con los peneidos americanos, los camarones moribundos presentan una coloración rosada a rojiza (de ahí el nombre de la “enfermedad roja”) debido a la expansión de cromatóforos del epitelio cuticular. En estos casos, la presencia de manchas blancas es limitada o ausente (ver las figuras adjuntas).

Las poblaciones de camarón que presentan estos síntomas clínicos tienden a exhibir altas tasas de mortalidad acumulada, alcanzando hasta el 100% de 3 a 10 días después de que se observan los primeros síntomas.

3.3.4 Procedimientos de diagnóstico en casos de enfermedad

3.3.4.1 Diagnóstico presuntivo

- La presencia de síntomas clínicos tal y como han sido descritos en la Sección 3.1.3.
- Historial de las instalaciones de cultivo, de la especie cultivada, o de la región, que indique la posibilidad de que haya una infección por WSSV (por ejemplo, la importación previa de camarones peneidos, ya sea PLs, reproductores, etc., desde una región en donde recientemente haya habido un brote de WSSV).
- Demostración de núcleos hipertrofiados y vacuolizados, visibles en preparaciones o improntas de tejido epitelial y tejido conectivo del estómago y/o de las branquias, en camarones que exhiban síntomas clínicos de la enfermedad tal y como se describió en la Sección 3.1.3.

3.3.4.2 Métodos para la detección y el diagnóstico definitivo del virus

Para llegar a un diagnóstico definitivo de WSSV, se pueden utilizar cualquiera de los siguientes métodos:

3.3.4.2.1 Métodos histológicos de rutina

- El diagnóstico histológico de WSSV está basado en la demostración de inclusiones intranucleares prominentes, de color eosinófilo a basófilo pálido (con tinción de H&E), Feulgen positivas, las cuales se encuentran dentro de núcleos hipertrofiados, comúnmente en las células epiteliales y el tejido conectivo y con menos frecuencia en el epitelio de la glándula antenal, en las células parenquimales del órgano linfóide, en el tejido hematopoiético y en los fagocitos fijos localizados dentro del corazón (ver figuras adjuntas).

- Los cuerpos de oclusión están completamente ausentes en las infecciones de WSSV.
- Durante la fase temprana de desarrollo, los cuerpos de inclusión de WSSV son eosinofílicos, centro-nucleares, rodeados de un halo claro y un anillo de cromatina (un artefacto de la fijación con solución de Davidson), lo cual los hace muy parecidos a los cuerpos de inclusión de IHHNV. En este estadio es difícil distinguir entre ambos, a menos que se utilice hibridación *in situ* con sondas genéticas específicas.
- Sin embargo, durante la etapa más avanzada de la infección de WSSV, los tejidos infectados presentan cuerpos de inclusión más grandes y más desarrollados, no muestran un halo y son de un color basofílico pálido, lo cual los hace fácilmente distinguibles de los cuerpos de inclusión de IHHNV. Usualmente los núcleos de las células infectadas por WSSV presentan una sola inclusión, pero ocasionalmente se pueden llegar a observar inclusiones múltiples (ver las figuras adjuntas).

3.3.4.2.2 Método rápido de campo para la tinción de preparaciones en húmedo.

Este método está basado en la visualización de cuerpos de inclusión intranucleares de WSSV, a partir de tejidos previamente fijados en solución de Davidson. Las piezas de tejido fijado son rehidratadas, teñidas con hematoxilina-eosina de Mayer-Bennet y examinadas con un microscopio compuesto.

Este protocolo fue diseñado originalmente en China y luego modificado en la Universidad de Arizona para la detección rápida de WSSV. Con este método, el biólogo encargado de cualquier laboratorio de producción de postlarvas o granja, puede efectuar un diagnóstico definitivo si previamente se ha familiarizado con la apariencia microscópica de las lesiones causadas por WSSV (a como se observan por medio de histología con tinción H&E).

En el libro titulado “A handbook of pathology and diagnostic procedures for the

major diseases of penaeid shrimp” (Lightner 1996) es posible encontrar referencias fotográficas, otros métodos de diagnóstico, y una descripción de las síntomas clínicos y de las lesiones causadas por WSSV a nivel histológico.

Materiales y equipo:

A continuación se proporciona una lista de los materiales necesarios:

- Microscopio compuesto
- Pipetas Pasteur o gotero
- Tijeras y navaja fina o bisturí
- Pinzas de punta fina
- Portaobjetos y cubreobjetos de vidrio
- Solución fijadora de Davidson
- Papel filtro o bolsas de té vacías (para envolver las piezas de tejido)
- Seis contenedores pequeños (25-100 ml de capacidad) o cajas de Petri
- etanol al 50 y 70%
- Hematoxilina (de Mayer/Bennett)
- Eosina “Y” al 2% (solución acuosa)
- Agua corriente
- Agua destilada

Selección de la muestra:

Para llevar a cabo esta prueba se deben de utilizar únicamente animales moribundos o que muestren síntomas agudos de la infección (por ejemplo, letargia, coloración café obscura o rojiza, altas tasas de mortandad, etc.). Al menos en el caso *Penaeus vannamei* or *P. stylirostris* no es común observar las manchas blancas que característicamente se observan en otras especies tales como *P. monodon*.

Fijación:

Este protocolo ha sido diseñado para su uso con camarones o partes de camarón que han sido previamente fijados con solución de Davidson AFA (4-24 horas) y luego transferidos a alcohol etílico al 70%.

Procedimiento:

- Tome la muestra y fijela con la solución de Davidson siguiendo el método usual.
- Prepare seis contenedores con las siguientes soluciones:
 - a) etanol 70% d) hematoxilina
 - b) etanol 50% e) agua corriente
 - c) agua destilada f) eosina “Y” al 2%
 (para prevenir evaporación mantenga los contenedores cubiertos).

- Después de un período mínimo de fijación de 4 horas para postlarvas y juveniles pequeños (o piezas de tejido) y de 24 horas para juveniles grandes y adultos, remueva el estómago y ambas cubiertas de las branquias (la capa de cutícula que recubre a la cámara branquial). Envuelva los tejidos en papel poroso o colóquelos dentro de una bolsa de té vacía para evitar perderlos durante los lavados.
- Sumerja el paquete de tejidos en el alcohol al 70% por un período de 1 hora y media. Haga un cambio de alcohol fresco al 70% y deje los tejidos en el mismo por otra hora y media. Nota: no deje que los paquetes se sequen durante ninguna de las fases de este procedimiento.
- Escurra bien el paquete al sacarlo del alcohol al 70%, y transfíralo aún húmedo al alcohol al 50%, en donde deberá de permanecer por 15 minutos.
- Escurra el paquete y transfíralo al contenedor con agua destilada por un periodo de tiempo de 5 minutos. Reemplaze el agua 6 veces durante este lapso de tiempo. Escurra el exceso de agua del paquete y transfíralo a la hematoxilina por un período de tiempo de 25 minutos.
- Escurra la hematoxilina y sumerja el paquete en agua corriente por un período de 25 minutos. Reemplaze el agua 6 veces durante este lapso de tiempo.
- Escurra el exceso de agua y coloque el paquete en la solución de eosina al 2% por un período de tiempo de 1-2 minutos.
- Enjuague el paquete brevemente con agua destilada.
- Coloque la muestra sobre una gota de agua destilada en un portaobjetos limpio. Examine por separado los tejidos de un solo animal.
- Con la ayuda de unas pinzas de punta fina, desprenda de la cutícula del estómago (o de la cubierta de las branquias) la capa de epitelio y colóquela en el portaobjetos. Resulta un poco mas difícil desprender la capa de epitelio del estómago, pero éste es uno de los mejores órganos para la detección

de los cuerpos de inclusión de WSSV. Usando una navaja de rasurar, es posible cortar el estómago en piezas pequeñas (en cuadros de 2-3 mm) las cuales son colocadas en el portaobjetos y con pinzas finas se les puede desprender la capa de epitelio.

- Una vez que se han obtenido los fragmentos de tejido epitelial, se agrega un poco de agua si es necesario y se le coloca encima un cubreobjetos.
- Examine los tejidos con la ayuda de un microscopio compuesto (con aumentos de 20 o 40X). Los organismos infectados por WSSV presentan cuerpos de inclusión bastante prominentes, de tinción variable (de eosinofílico a basofílico), los cuales son aproximadamente 2-3 veces más grandes que el tamaño normal del núcleo y generalmente muy numerosos (ver figura adjunta). Los cuerpos de inclusión tempranos tienen un parecido muy grande a los cuerpos de inclusión tipo Cowdry A que aparecen a consecuencia de la infección por IHNV. Los cuerpos de inclusión de WSSV mas tardíos o maduros tienden a aparecer más basofílicos (generalmente de color morado) y de forma variable (de circular a irregular).

3.3.4.2.3 Diagnóstico de WSSV usando sondas genéticas.

- En varios países tales como, China, Japón, Tailandia, y los Estados Unidos, se han desarrollado sondas genéticas para la detección de WSSV.
- Los detalles de los procedimientos para el uso de estas sondas estan disponibles a través de las compañías o grupos distribuidores de las sondas o de los estuches (“kits”) completos para efectuar las pruebas. Los procedimientos para la aplicación de estas sondas en formato de hibridación *in situ* son muy similares a los que ya se explicaron en la sección 2.4 y 2.3 de este manual.
- Las células de los tejidos infectados por WSSV se tiñen intensamente en los lugares en donde la sonda se ha hibridado con el material genético del virus (ver figuras).

- El virus WSSV es “reconocido” únicamente por la sonda específica para WSSV. Ninguna de las otras sondas (por ejemplo para IHNV, BP, HPV, etc.) reacciona con WSSV.

3.3.4.2.4 Detección de WSSV por medio de la reacción de anticuerpos monoclonales.

Recientemente se ha desarrollado un método para la detección y diagnóstico de WSSV que hace uso de anticuerpos monoclonales (B. Poulos et al. “in Press”). Estos anticuerpos reaccionan con una de las proteínas estructurales del virus y pueden ser aplicados a muestras de especímenes fijados en solución de Davidson. Para el uso de los anticuerpos no es necesario embeber los especímenes en parafina (aunque el método también funciona en cortes histológicos en parafina).

La firma “DiaXotics” ha puesto en el mercado un estuche o “kit” que hace uso de estos anticuerpos mediante una técnica conocida como “Immunosquash”. El estuche de DiagXotics describe en detalle la metodología. Sin embargo, de manera breve, la técnica del “Immunosquash” consiste de los siguientes pasos:

- Fijación de las muestras en solución de Davidson por 24-48 horas dependiendo del tamaño del camarón. Transferencia de las muestras a alcohol étílico al 70%.
- Desmenuzamiento del tejido (generalmente branquias o estómago) en pequeños bloques de 2-4 mm.
- Rehidratación del tejido.
- Homogenización ligera del tejido.
- Tratamiento de bloqueo.
- Reacción con el anticuerpo contra WSSV (anticuerpo primario).
- Lavados para eliminar el exceso de anticuerpo primario.
- Reacción con un anticuerpo secundario.
- Lavado para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.
- Reacción de detección.
- Examen al microscopio.

Todas las reacciones se llevan a cabo dentro de un tubo de plástico de microcentrífuga. La reacción para la visualización de los anticuerpos es la misma que se usa en el

método de hibridación *in situ*, por lo tanto, en aquellas células en donde ocurra una reacción positiva se observará la presencia de un precipitado azul oscuro o negro (ver figura adjunta).

La sensibilidad de la técnica del “Immunosquash” es por lo menos igual a la de la hibridación *in situ* (la selección apropiada de la muestra es muy importante y se debe de seguir el mismo criterio que en la sección 3.1.4.2.2). El “Immunosquash” presenta las siguientes ventajas cuando se le compara con la hibridación *in situ*:

- No se requiere embeber el tejido en parafina.
- No se requiere equipo complejo o especializado para el procesamiento de las muestras.
- El tiempo para la obtención de resultados es de tan sólo unas horas (si se parte de muestras ya fijadas).

3.3.4.2.5 Detección de WSSV por medio de PCR.

Ver sección 2.6.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

WSSV



Figura 1. Cuatro juveniles *P. monodon* mostrando síntomas de la infección por WSSV. El camarón de la parte superior y el de la derecha casi no muestran manchas blancas, pero se puede distinguir una coloración rosada a café-rojiza causada por la expansión de los cromatóforos subcuticulares. Es posible que ésta coloración rojiza sea más aparente durante la etapa aguda de la enfermedad. El camarón de la izquierda y el de la parte inferior muestran las manchas blancas que característicamente aparecen en ésta especie al pasar la etapa aguda de la infección.



Figura 2. Caparazón de un juvenil de *P. monodon* con la enfermedad de la mancha blanca (WSSV). Las manchas blancas son depósitos calcáreos localizados en la porción interna del exoesqueleto. Fotografía cortesía P. Saibaba (S.K.B.R. College, Amalapuram, India).

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

WSSV



Figura 3. Caparazón de un juvenil de *P. vannamei* con la enfermedad de la mancha blanca (WSSV). Se a observado que en el caso de las especies de camarones peneidos americanos, la presencia de manchas blancas no es una característica muy común durante las epizootias de WSSV. Sin embargo se pueden llegar a presentar, como se observa en el espécimen que se muestra en esta figura.

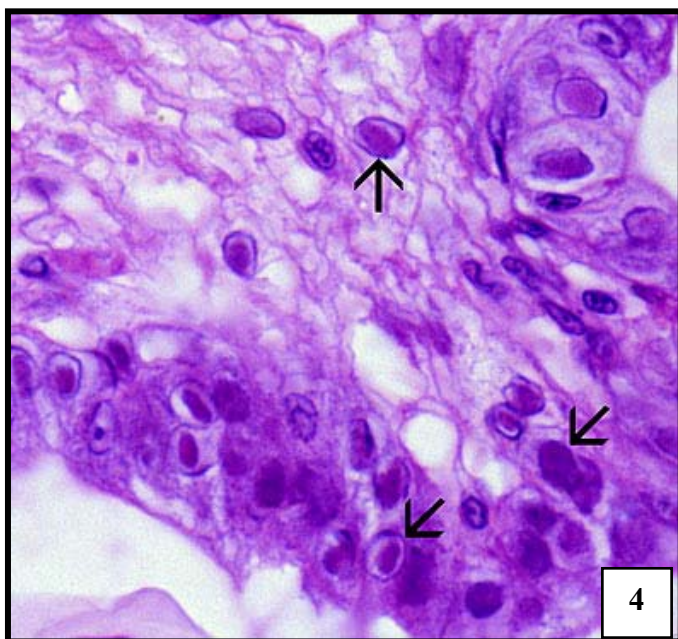


Figura 4. Microfotografía de un corte histológico a través del estómago de un juvenil *P. chinensis* infectado con WSSV. Se observa una abundancia de cuerpos de inclusión intranuclear prominentes, ubicados en el epitelio cuticular y el tejido conectivo sub-cuticular (algunos ejemplos son señalados por las flechas). Las células muestran cuerpos de inclusión intranuclear en diferentes fases de la infección. Predominando en este fotografía se pueden observar cuerpos de inclusión en la fase temprana de la infección, los cuales están localizados en la parte central del núcleo, son eosinofílicos y rodeados de un halo claro creado por un artefacto de fijación que los separa de las membranas nucleares y la cromatina marginada (lo cual los hace muy similares a los cuerpos de inclusión de IHHNV). Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación 900X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

WSSV



Figura 5. Corte histológico a través del estómago de un juvenil *P. stylirostris* infectado experimentalmente con WSSV. Se puede observar una abundancia (grado G4) de cuerpos de inclusión intranucleares característicos de WSSV (algunos ejemplos señalados con flechas). Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 900X.

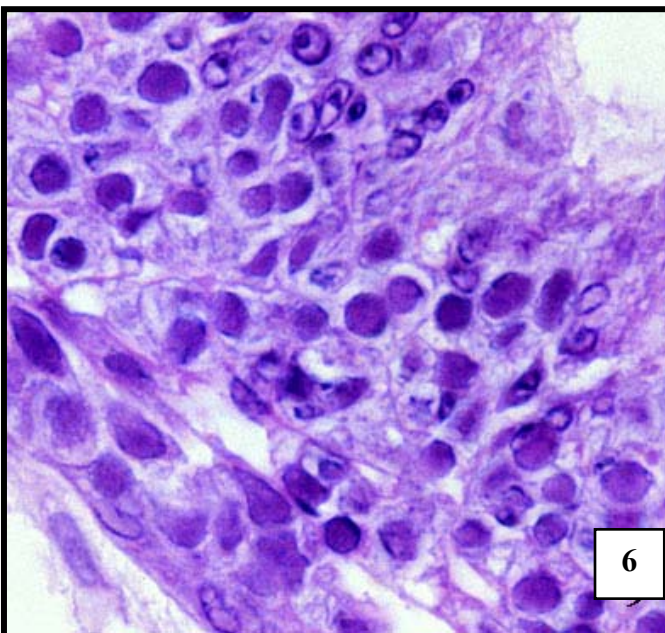


Figura 6. Corte histológico a través del estómago de un juvenil *P. vannamei* infectado experimentalmente con WSSV. Se puede observar una abundancia (grado G4) de cuerpos de inclusión intranucleares característicos de WSSV (algunos ejemplos señalados con flechas). Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 900X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

WSSV



Figura 7. Corte histológico a través del estómago de un juvenil *P. vannamei*, el cual ha sido sometido a una prueba de hibridación *in situ* con una sonda de ADN, marcada con DIG, específica para la detección de este virus. La sonda ha reaccionado intensamente con cuerpos de inclusión intranucleares (los cuales contienen WSSV) en varios tejidos del camarón incluyendo el epitelio cuticular del estómago. Tinción Bismarck Brown y sonda genética marcada con DIG. Magnificación: 900X.

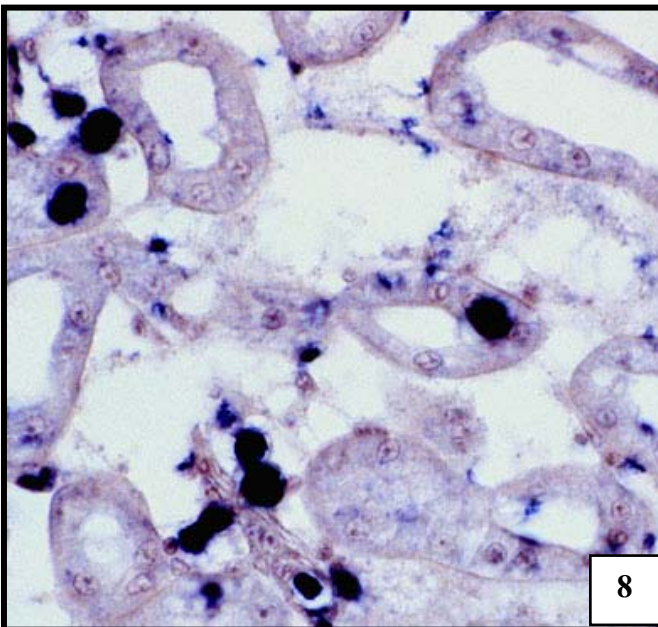


Figura 8. Corte histológico a través de la glándula antenal de un juvenil *P. vannamei*, el cual ha sido sometido a una prueba de hibridación *in situ* con una sonda de ADN, marcada con DIG, específica para la detección de este virus. Se muestra una reacción bastante intensa a la sonda dentro de los núcleos de las células infectadas en el epitelio de la glándula antenal. Tinción Bismarck Brown y sonda genética marcada con DIG. Magnificación: 450X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

WSSV

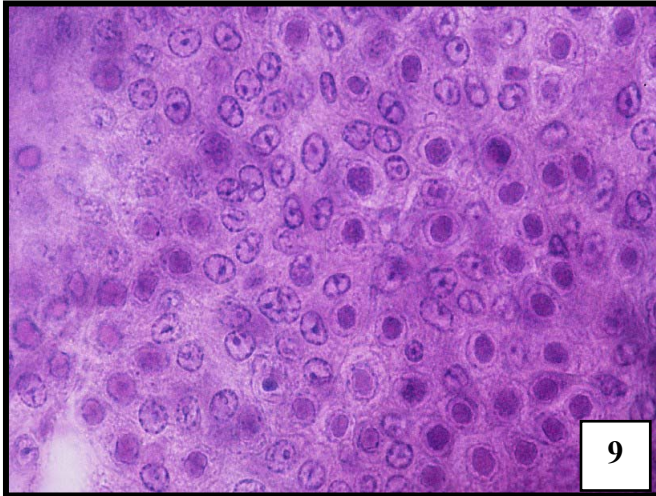


Figura 9. Ejemplo del método rápido de campo para la tinción de preparaciones en húmedo para el diagnóstico de WSSV (Sección 3.3.4.2.2). Esta microfotografía ilustra el resultado final después de la tinción con H&E de Mayer-Bennett. El tejido que se muestra es epitelio cuticular de la cubierta de la cámara branquial. Se pueden observar claramente los cuerpos de inclusión intranuclae característicos de WSS.

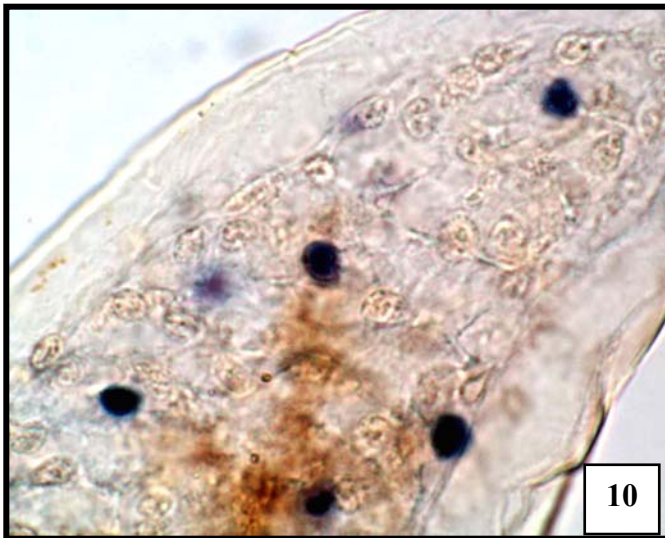


Figura 10. Ejemplo de los resultados obtenidos al usar anticuerpos monoclonales para la detección de WSSV por medio del método de “Immuno-squash”. Esta fotomicrografía muestra una porción de una lamela branquial y la deposición de un precipitado azul oscuro dentro de los núcleos de las células infectadas por WSSV en donde los anticuerpos han reconocido las partículas virales. Tinción: Bismarck Brown.

3.4 Virus del Síndrome de Taura.

3.4.1 Nombre del agente etiológico y de la enfermedad.

Virus del Síndrome de Taura (TSV); Síndrome de Taura (TS); enfermedad de Taura; enfermedad de la cola roja.

3.4.1.1 Agente

Debido a que presenta las siguientes características, el virus del síndrome de Taura (TSV) ha sido clasificado tentativamente como un miembro de la familia Picornaviridae: tiene una morfología icosaédrica, las partículas tienen un diámetro promedio de 30-32 nanómetros, tienen una densidad de 1.337 g/ml, el tipo de replicación es citoplásmico, los sitios de replicación son Feulgen negativos, contiene ARN de una sola cadena con una longitud de aproximadamente 9 kb, y la cápside está compuesta de tres proteínas estructurales principales (49, 36.8 y 23 kDa) y dos secundarias (51.5 y 52.5 kDa).

3.4.1.2 Métodos preferidos actualmente para la detección y el diagnóstico.

- Histología de rutina con tinción de H&E.
- Hibridación *in situ* con sondas genéticas específicas para TSV.
- Bioensayos en combinación con histología utilizando camarones juveniles SPF *P. vannamei* como indicadores de la presencia de TSV.
- Detección del virus por medio de RT-PCR.

3.4.2 Rango geográfico de distribución y especies afectadas

3.4.2.1 Rango geográfico

- TSV se encuentra distribuido en países de Centro y Sudamérica. Recientemente fue detectado en Taiwan en granjas donde se habían introducido postlarvas de *P. vannamei*.
- El síndrome de Taura fue reconocido por primera vez como una enfermedad única en granjas camaroneras en la cercanía de

la boca del río Taura en Guayaquil, Ecuador, en junio de 1992

- Sin embargo, a través de un análisis retrospectivo de muestras de camarón tomadas en la región de Taura en Ecuador en septiembre de 1991, se demostró que la enfermedad ya estaba presente en esta región antes de 1992. De la misma manera, algunos granjeros de la región sospechan que la enfermedad ya estaba presente a mediados de 1990, cuando se observaron pérdidas inexplicables durante la fase de crianza de *P. vannamei* forzando a varios granjeros a abandonar el uso de estanques de crianza y adoptando en su lugar la práctica de “siembra directa” de postlarvas a densidades relativamente bajas en los estanques de engorda.
- Análisis retrospectivos de muestras de *P. vannamei* tomadas en Colombia en febrero de 1990 también han revelado la presencia de lesiones similares a las observadas en casos de síndrome de Taura (Laramore 1995).
- A partir de 1992, el síndrome de Taura se ha dispersado a muchas de las regiones del continente americano, en donde ha sido observado tanto en camarones silvestres como cultivados. Casos documentados de síndrome de Taura se han originado en:
 - Regiones de cultivo a lo largo de las zonas camaroneras de Ecuador (1991 al presente).
 - La región de Tumbes, Perú (1993 al present).
 - Costas del Pacífico y Caribe de Colombia (1993/94 al presente).
 - El Golfo de Fonseca en la región de Honduras y en El Salvador (1994 al presente).
 - Guatemala (1994).
 - Noreste del Brazil (1994).
 - Nicaragua (1995).
 - Estados de Sonora, Sinaloa, Chiapas y Guerrero en México (1995).
 - Texas (1995), Hawai (1994) y Florida (1994) en los Estados Unidos de Norteamérica.

- TSV ha sido documentado en postlarvas y adultos silvestres de *P. vannamei* capturados cerca de la costa de Ecuador, El Salvador, y el estado mexicano de Chiapas, cerca de la frontera con Guatemala.
- Es posible que la distribución geográfica del síndrome de Taura continúe expandiéndose debido a que la industria depende en gran parte de las poblaciones silvestres de nauplios, postlarvas y reproductores, los cuales son transportados a diferentes regiones geográficas e incluso países.

3.4.2.2 Especies afectadas

- El rango de especies afectadas no se conoce completamente.
- Se han documentado infecciones en poblaciones silvestres de *P. vannamei*, *P. stylirostris* y *P. setiferus*.
- Se ha logrado infectar experimentalmente postlarvas y juveniles de *P. setiferus*, postlarvas de *P. aztecus* y juveniles de *P. chinensis*.
- En el estadio de postlarva (de ~PL-12 en adelante) y de juvenil de *P. vannamei* TSV causa infecciones serias y altas mortandades en poblaciones de camarón cultivado.
- En contraste, aunque TSV puede infectar juveniles de *P. stylirostris*, esta especie parece ser menos susceptible a la infección.
- Los estadios de postlarva y de juvenil de *P. aztecus* y *P. duorarum* parecen ser resistentes a esta enfermedad.

3.4.3 Síntomas clínicos de importancia diagnóstica

3.4.3.1 Síntomas del síndrome de Taura

- El síndrome de Taura es muy conocido como una enfermedad que se presenta durante la fase de crianza de *P. vannamei*, lo cual ocurre de los 14 a los 40 días después de la siembra de las postlarvas en

los estanques. Por lo tanto, los camarones afectados tienden a ser típicamente juveniles de aproximadamente 0.05 gr. a menos de 5 gr. Los camarones más grandes también pueden ser afectados, especialmente si nunca han sido expuestos al virus.

- La enfermedad exhibe una fase aguda y otra de recuperación (crónica), las cuales pueden distinguirse a simple vista.

- **Fase Peraguda/aguda:** En los camarones moribundos, durante la fase peraguda de la enfermedad, los síntomas observables a simple vista incluyen expansión de los cromatóforos rojos, lo cual le imparte al camarón una coloración general que va de rosada a rojiza y a los urópodos una coloración roja (de ahí el nombre de la enfermedad de la cola roja). Los animales en la fase peraguda tienden a morir durante la ecdisis (el proceso de muda; ver figuras adjuntas).

En estos animales, cuando se examina con más detenimiento el epitelio cuticular, por ejemplo de un apéndice (en la punta de los urópodos o de los pleópodos, por ejemplo), es posible observar evidencia de necrosis multifocal del epitelio (ver las figuras adjuntas).

Los camarones que muestran estos síntomas peragudos, generalmente también tienen la cutícula suave, el intestino vacío, y se encuentran en el estadio D del ciclo de muda.

Los animales con infección peraguda severa mueren típicamente durante la ecdisis, lo cual sugiere que el proceso de muda es una parte importante de la patogénesis del síndrome de Taura.

- **Fase crónica/recuperación:** En los estanques, cantidades bajas o moderadas de camarón tienden a presentar lesiones multifocales melanizadas del tipo de la enfermedad de la concha (ver figuras adjuntas).

Los camarones en esta fase de la enfermedad pueden o no que presenten

cutícula blanda y expansión de los cromatóforos rojos. Es posible observar a tales camarones comportándose y alimentándose normalmente.

Estos camarones son sobrevivientes de la etapa peraguda o aguda de la enfermedad, los cuales al haber mudado exitosamente muestran las lesiones melanizadas en vías de recuperación.

Aunque una epizootia de síndrome de Taura puede resultar en mortandades acumuladas que van del 80% al 90% de la población en un estanque, los sobrevivientes típicamente muestran sobrevivencias de 60% o más al tiempo de la cosecha.

3.4.4 Procedimientos de diagnóstico en casos de enfermedad

3.4.4.1 Diagnóstico presuntivo

- La presencia de signos clínicos tal y como se describen en la sección 3.2.3.
- Un historial ya sea de las instalaciones de cultivo, de la especie cultivada o de la región, que indique la posibilidad de infección por TSV (por ejemplo la importación de *P. vannamei* originario de Ecuador o de otras regiones en donde se sabe que existe TSV).
- Preparaciones húmedas de apéndices (urópodos, escamas antenales, pleópodos, etc.) que muestren necrosis multifocal del epitelio cuticular en animales juveniles durante la fase peraguda/aguda de la enfermedad (ver las figuras adjuntas).

3.4.4.2 Métodos para la detección y el diagnóstico definitivo del virus

Para llegar a un diagnóstico definitivo de TSV, tanto en camarones individuales como en poblaciones enteras, se pueden utilizar cualquiera de los siguientes métodos:

3.4.4.2.1 Metodos histológicos de rutina

- El diagnóstico histológico de la enfermedad (con tinción H&E), durante la fase aguda/peraguda, se basa en la demostración de áreas de necrosis

multifocal en el epitelio cuticular del caparazón, apéndices, branquias, esófago, estómago e intestino posterior (ver figuras adjuntas).

- Sólo muy raramente el epitelio de los túbulos de la glándula antenal se ve afectado.

- Con frecuencia, el tejido conectivo subcuticular y las fibras adyacentes de músculo estriado también se ven afectadas.

- Las lesiones cuticulares multifocales son muy conspicuas y consisten de lo siguiente:
 - El citoplasma de las células afectadas muestra un incremento en la eosinofilia.
 - La picnosis nuclear y kariorrhexis son una característica común en las lesiones de síndrome de Taura.
 - En ocasiones es posible observar la presencia de inclusiones citoplásmicas y frecuentemente una abundancia extrema de cuerpos esféricos (de 1 a 20 μm de diámetro) que van de eosinofílicos a basofílicos pálidos (ver figuras adjuntas).
 - Los núcleos picnóticos y kariorréticos dan una reacción positiva con la tinción de Feulgen (para ADN), lo cual los distingue de las inclusiones citoplásmicas eosinofílicas/basofílicas pálidas que no contienen ADN.
 - La ausencia de infiltración hemocítica, o de otro tipo de respuesta inflamatoria, distingue la fase peraguda de la fase de recuperación o crónica de la enfermedad.
- La presencia de núcleos picnóticos y kariorréticos así como de las inclusiones citoplásmicas generalmente esféricas le dan a las lesiones de la fase aguda/peraguda una apariencia aperdigonada o apimentada, lo cual es considerado como una característica patognomónica de la enfermedad (ver figuras adjuntas).
- Durante la fase de recuperación o crónica de la enfermedad, las lesiones cuticulares asemejan aquellas ocasionadas por infección bacteriana de la concha (“shell disease”) (ver figuras adjuntas).
 - Estas lesiones pueden llegar a presentar erosión de la cutícula, colonización bacteriana superfi-

cial e invasión de la cutícula por presuntas especies de *Vibrio*.

- Una marcada infiltración hemocítica, la cual puede o no estar melanizada, se encuentra con frecuencia en posición basal con respecto a las lesiones cuticulares melanizadas.
- Durante la fase de recuperación o crónica de la enfermedad es común observar la presencia de estructuras dentro del órgano linfoide conocidas como “esferoides” (ver figuras adjuntas). Se ha observado que en camarones durante la fase crónica de la enfermedad (los cuales pueden carecer de las lesiones cuticulares diagnósticas) estos esferoides muestran una reacción positiva a la sonda genética, sugiriendo una relación estrecha con el proceso de la enfermedad.

3.4.4.2.2 Diagnóstico de TSV usando sondas genéticas

Recientemente se ha desarrollado una sonda genética de ADN complementario (cADN) la cual provee excelente sensibilidad diagnóstica en casos de infección por TSV.

- La sonda genética, no radioactiva y marcada con DIG, puede ser usada en ensayos de hibridación *in situ*.
- La sonda genética para la detección de TSV está disponible en el mercado a través de la compañía DiagXotics, Inc.

3.4.4.2.2.1 Hibridación *in situ*

- La prueba de hibridación *in situ* puede ser aplicada a muestras de tejido fijadas de acuerdo al procedimiento explicado en la sección 2.5 o de acuerdo a las modificaciones y con los reactivos del kit distribuido por DiagXotics.
- Cuando son sujetas a la prueba de hibridación *in situ* con las sondas cADN, las lesiones patognomónicas de TSV muestran una reacción positiva bastante prominente en la forma de un precipitado que va de azul a negro y el cual está

localizado en el citoplasma de las células afectadas (ver figuras adjuntas).

- Los fragmentos nucleares picnóticos y kariorréticos que contribuyen a la apariencia aperdigonada o apimentada de las lesiones patognomónicas no reaccionan con la sonda genética (ver figuras adjuntas).

3.4.4.2.2.2 Hibridación en formato “Dot blot”

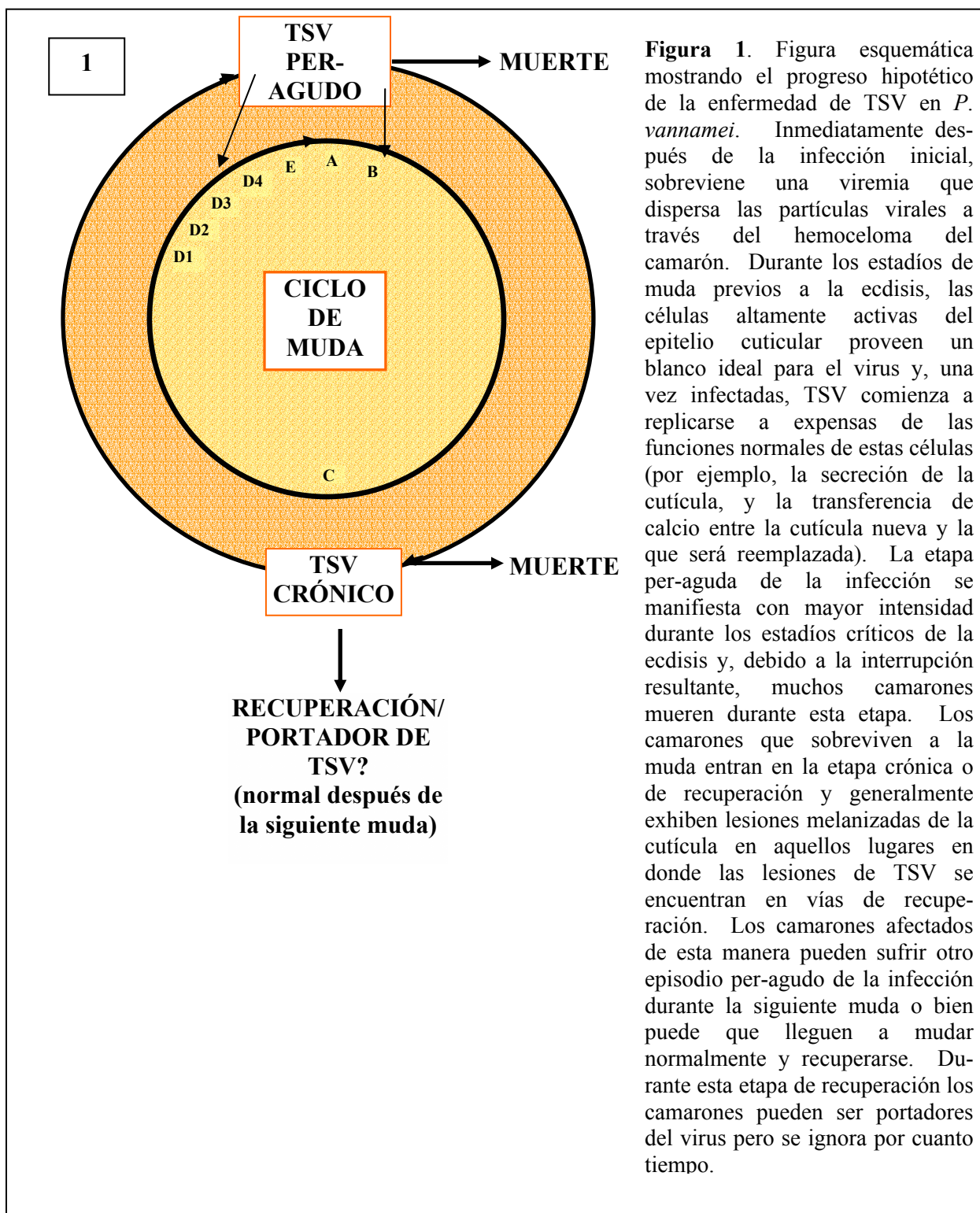
- El ensayo de hibridación en formato de “dot blot” ha sido aplicado solamente a nivel experimental para el diagnóstico con sondas no radioactivas marcadas con DIG y usando muestras de hemolinfa y virus semipurificado.
- Problemas relacionados con la estabilidad del ARN de una sola cadena (el cual constituye el genoma de TSV) durante la prueba de “dot blot” ha limitado el desarrollo y la aplicación de este tipo de estuches de campo basados en el uso de sondas cADN marcadas con DIG para la detección de este agente.

3.4.4.2.3 Detección de TSV por medio de RT-PCR.

Ver sección 2.7.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

TSV



ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

TSV



Figura 2. Dos ejemplares de camarón cultivado *P. vananmei* colectados en Ecuador. Ambos especímenes se encontraron moribundos y con signos de la fase per-aguda del síndrome de Taura. Durante la etapa per-aguda los camarones se encuentran generalmente aletargados, tienen una cutícula blanda y los urópodos pueden llegar a tomar una coloración rojiza.

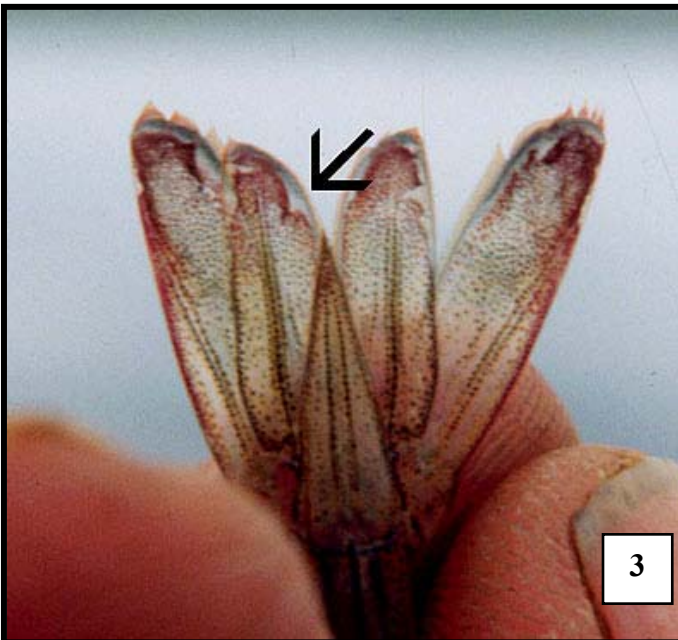


Figura 3. Fotografía, a mayor aumento, de los urópodos de uno de los camarones mostrados en la Figura 1. Usando una lupa, o una cámara fotográfica con lente de acercamiento, es posible observar la irregularidad de los bordes del epitelio cuticular de los urópodos (señalado por la flecha). Estas irregularidades en el epitelio son la manifestación de la necrosis causada en este tejido por el virus de TSV. Magnificación: aproximadamente 10X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

TSV



Figura 4. Juvenil de *P. vannamei* capturado en un estanque de cultivo en Ecuador. Este ejemplar se encuentra en la etapa crónica, o de recuperación, de TSV. Se pueden observar múltiples focos de melanización que señalan los sitios de la cutícula en donde el epitelio necrosado por la infección de TSV se encuentra en vías de recuperación.



Figura 5. Corte histológico a través del estómago de un juvenil *P. vannamei* en la etapa per-aguda de infección por TSV. Se muestran áreas necróticas prominentes (la flecha gruesa señala un ejemplo) en el epitelio cuticular, el cual normalmente secreta la parte acelular de la cutícula. Adyacente a las lesiones necróticas focales es posible observar células epiteliales aparentemente normales (la flecha delgada señala algunos ejemplos). Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación 300X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

TSV

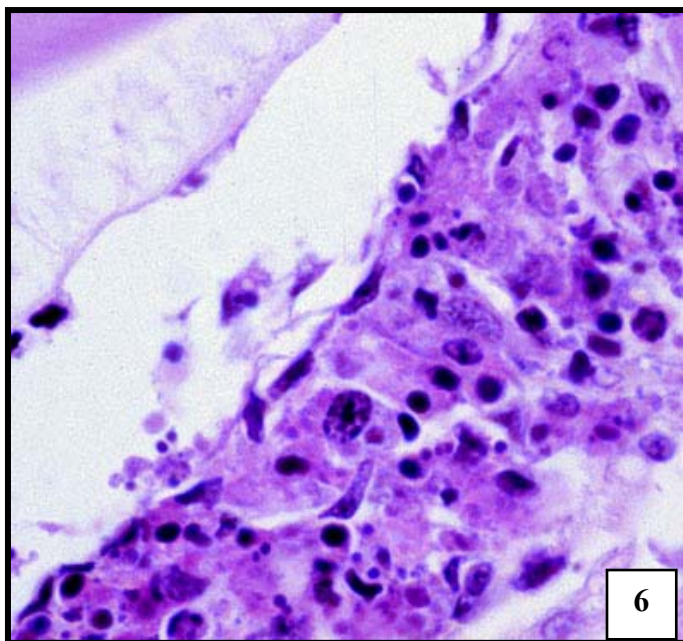


Figura 6. Microfotografía de alto aumento mostrando una lesión clásica de TSV. Este tipo de lesiones consiste de necrosis del epitelio cuticular y del tejido conectivo sub-cuticular, con células mostrando núcleos picnóticos o kariorréticos, así como también una marcada eosinofilia e inclusiones citoplasmáticas con propiedades variables de tinción. Las inclusiones citoplasmáticas y los núcleos picnóticos y kariorréticos le imparten a la lesión su apariencia característica (patodiagnóstica) aperdigonada (“buckshot-riddled”) o apimientada (“peppered”). Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 900X.

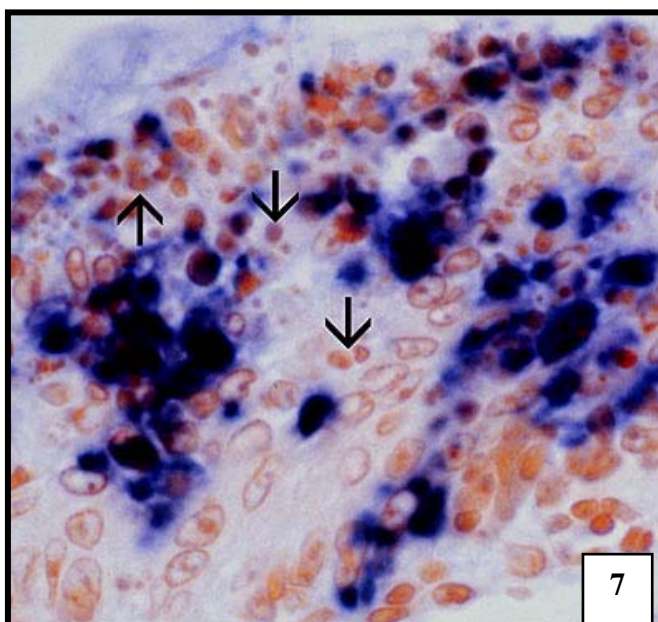


Figura 7. Corte histológico a través de uno de los apéndices de una postlarva de *P. vannamei* en la fase per-aguda de infección por TSV. Este ejemplar ha sido sometido a una prueba de hibridación *in situ* con una sonda genética de cADN marcada con DIG, específica para la detección de TSV. La sonda ha reaccionado intensamente con células infectadas en donde es posible observar un precipitado azul oscuro o negro dentro del citoplasma de células del epitelio cuticular y del tejido conectivo sub-cuticular. La sonda no ha reaccionado con los núcleos picnóticos o kariorréticos, lo cual es de esperarse ya que TSV es un virus citoplásmico. Los restos de los núcleos contribuyen a dar la apariencia apimientada típica de las lesiones de TSV.

Tinción: Bismarck Brown y sonda genética marcada con DIG. Magnificación: 900X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

TSV

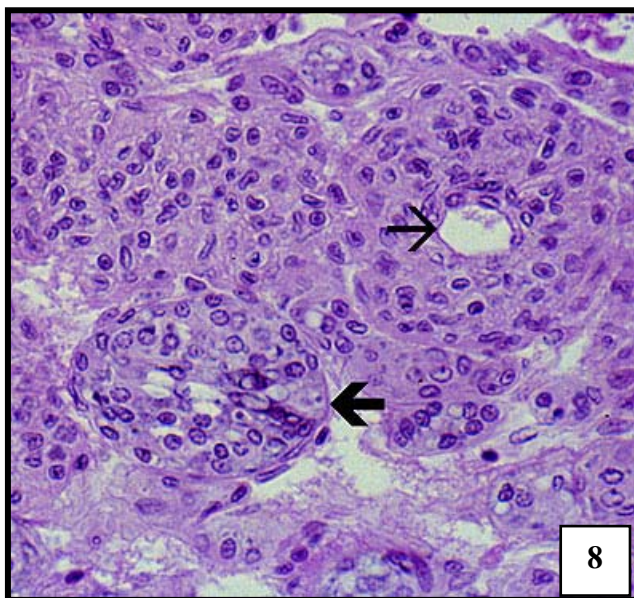


Figura 8. Corte medio-sagital a través del órgano linfoide (OL) de un juvenil *P. vannamei* infectado experimentalmente con TSV. Al momento de la fijación, el espécimen se encontraba en la fase crónica o de recuperación de la enfermedad. A pesar de que las lesiones patognomónicas de TSV del tipo que se observan en el epitelio cuticular nunca ocurren en el OL, la infección por TSV sí induce lesiones de otro tipo en este órgano. Entremezclado con los cordones de tejido normal del OL, los cuales se caracterizan por su arquitectura de varias capas de células arregladas concéntricamente alrededor de un conducto central para la hemolinfa (se señala un ejemplo con una flecha delgada), se encuentran acumulaciones desorganizadas

de células del OL, las cuales forman estructuras a las que se les ha llamado “esferoides” del OL (EOL). Los EOL carecen de un conducto central y consisten de células que muestran kariomegalia, vacuolas citoplasmáticas bastante prominentes e inclusiones citoplasmáticas de tamaño y forma irregular (la flecha gruesa muestra un ejemplo de un esferoide). Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 450X.

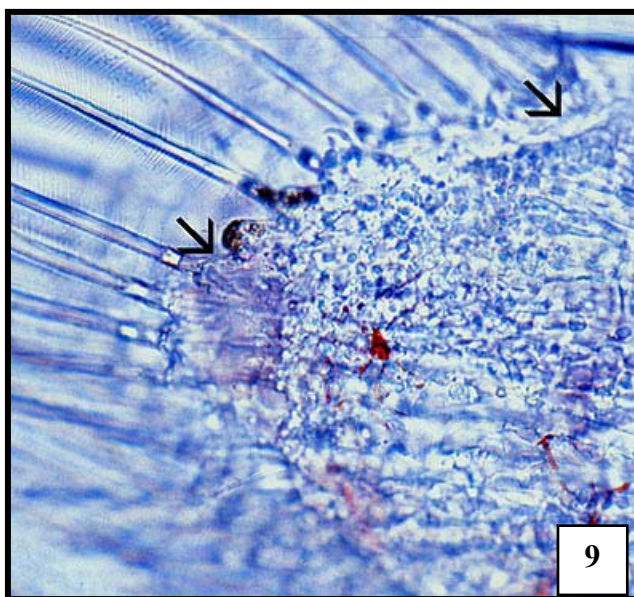


Figura 9. Preparación en húmedo que muestra la porción de un urópodo de una postlarva de *P. vannamei* en la etapa per-aguda de la infección por TSV. Este espécimen se encontraba en el estadio D_4 del ciclo de muda (según la separación que se puede observar entre la cutícula “vieja” y la “nueva”). La flecha de la izquierda señala un área necrótica en el epitelio cuticular (área desorganizada y con una abundancia de pequeñas esferas refráctiles, las cuales son en realidad núcleos picnóticos y kariorréticos) mientras que la flecha en la esquina superior derecha señala una porción de epitelio cuticular aparentemente normal. Se pueden observar también algunos cromatóforos rojos en el tejido conectivo sub-cuticular del urópodo. Tinción:

Preparación en húmedo sin teñir. Magnificación: 300X.

3.5 Virus del síndrome de la cabeza amarilla.

3.5.1.1 Nombre de la enfermedad y del agente etiológico

Enfermedad de la cabeza amarilla, enfermedad (YH) o enfermedad de la cabeza amarilla de *P. monodon*.

Virus de la cabeza amarilla (YHV).

Inicialmente algunos investigadores tailandeses reportaron que YHV era un baculovirus citoplásmico Tipo B (virus de la granulosis) o un virus similar a un baculovirus y le asignaron el nombre de baculovirus de la cabeza amarilla o YHB.

3.5.1.2 Agente

- YHV no es un baculovirus ya que no contiene cdADN (cadena doble de AND) sino csARN (cadena sencilla de ARN).
- El virus de la cabeza amarilla es un virus de ARN de cadena sencilla (ssARN), tiene forma cilíndrica, presenta una envoltura y es de replicación citoplásmica. Anteriormente se pensaba que podría estar relacionado con la familia *Rhabdoviridae*, pero de acuerdo a investigaciones más recientes se ha descubierto que presenta características más concordantes con las de la familia *Coronaviridae*.
- Los viriones tienen forma cilíndrica y varían en tamaño en un rango de 150 nm a 200 nm de longitud por 40 nm a 50 nm de ancho. Las estructuras que posiblemente sean las nucleocapsides (y/o formas aberrantes de nucleocapsides miden aproximadamente 15 nm de diámetro con longitudes variables de hasta aproximadamente 800 nm de largo.

3.5.1.3 Métodos preferidos actualmente para el diagnóstico

- Historial y signos clínicos de YHV.
- Métodos histológicos de rutina con tinción H&E.

- Tinción de hemocitos con el método de rutina de Wright-Giemsa.
- Detección del virus por medio de RT-PCR.
- Hibridación *in situ* con sondas genéticas específicas para la detección de YHV.

3.5.2 Rango geográfico de distribución y especies afectadas

3.5.2.1 Rango geográfico

Aparentemente YH es una enfermedad ampliamente distribuida en poblaciones de *P. monodon*.

Aunque hasta hace relativamente poco la enfermedad de la cabeza amarilla fue reconocida y descrita por primera vez en camarones de Tailandia, es probable que YHV haya sido el mismo síndrome que ha venido afectando a la industria del cultivo de *P. monodon* por casi una década. Es posible que YHV haya sido responsable del hundimiento de la industria de Taiwan en 1986-1987, y de epizootias más pequeñas, pero serias, en regiones de Indonesia, Malasia, China y Filipinas que cultivan *P. monodon*.

Hace relativamente poco, se reportó la presencia de YHV en el continente americano (Loh et al. 1998), sin embargo el hallazgo nunca pudo ser confirmado y es probable que se haya tratado más bien de un diagnóstico erróneo. Hasta el momento, la presencia de YHV en el continente americano no ha sido confirmada.

3.5.2.2 Especies afectadas

- YHD es una enfermedad importante en sistemas intensivos de cultivo de *P. monodon* en el sureste de Asia e India.
- A través de biosensayos con *P. monodon* como especie indicadora, se encontró que camarones de agua salobre de las especies *Palaemon styliferus* y *Acetes* sp. (presentes en los estanques de camarón) son portadores de YHV (Flegel et al. 1995).

- Aunque resistentes a la enfermedad cuando se encuentran en los estanques, se ha observado que *P. merguensis* y *Metapenaeus ensis* pueden ser infectados experimentalmente durante pruebas de reto (Flegel et al. 1995).
- Se ha demostrado experimentalmente que YHV puede infectar y causar infecciones serias en los estadios juveniles de los camarones peneidos americanos de las especies *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. setiferus*, *P. aztecus* y *P. duorarum*. En estos mismos estudios, se observo que los estadios de postlarva de las mismas especies eran relativamente resistentes.

3.5.3 Síntomas Clínicos de Importancia Diagnóstica

Existen ciertos síntomas clínicos característicos que pueden ser observados en *P. monodon* cuando éste ha sido infectado por YHD. Durante varios días, los juveniles y los subadultos (especialmente durante los 50-70 días de cultivo) en estanques intensivos de cultivo muestran un incremento anormal y abrupto en el consumo de alimento. Posteriormente los animales dejan de alimentarse completamente y dentro de un plazo de un día es posible observar algunos camarones moribundos nadando lentamente cerca de la superficie en las orillas de los estanques. Estos camarones moribundos pueden llegar a exhibir una coloración amarillenta del cefalotórax. El número de camarones mostrando síntomas similares incrementa dramáticamente en el segundo día y para el tercero, después de haber cesado de alimentarse, comienza una mortandad masiva la cual típicamente resulta en la pérdida total del estanque.

Los camarones moribundos pueden llegar a presentar con frecuencia uno o más de los siguientes síntomas: palidez corporal generalizada en combinación con una coloración amarillenta del cefalotórax; branquias blanquecinas o de color amarillo pálido a café; hepatopáncreas de color amarillo pálido.

Se ha reportado que en una ocasión en que incidentalmente se encontraron postlarvas de *P. merguensis* en el mismo estanque en que se hallaba una población de *P. monodon* infectado

por YHV, las postlarvas de *P. merguensis* no presentaban ningún síntoma de la enfermedad.

3.5.4 Procedimientos de diagnóstico en casos de enfermedad

3.5.4.1 Diagnóstico presuntivo

3.5.4.1.1 Historial y signos clínicos.

- Presencia de los signos clínicos descritos en la Sección 3.3.3.
- Un historial que indique la posible presencia de YHV en las instalaciones de cultivo, en la región o en las especies de camarón usadas para el cultivo.

3.5.4.2 Diagnóstico definitivo

El diagnóstico definitivo se basa en el historial, la presencia de signos clínicos descritos en la Sección 3.3.3 y la confirmación por medio de histopatología.

3.5.4.2.1 Histopatología

La histopatología se caracteriza por una necrosis generalizada, de multifocal a difusa, con presencia prominente de picnosis y kariorrexis. En los tejidos afectados es posible observar inclusiones citoplasmáticas perinucleares basofílicas, generalmente esféricas. Entre los tipos de células o tejidos afectados se incluyen los hemocitos, órgano linfóide, tejido hematopoiético, células pilar y epiteliales de las lamelas branquiales, tejido conectivo esponjoso del subcutis, músculo, intestino, glándula antenal, gónadas, cordón y ganglios nerviosos, etc. (ver figuras adjuntas).

Entre los cambios celulares tempranos ocasionados por YHV se incluye la hipertrofia nuclear, disminución y marginación de la cromatina y desplazamiento lateral del nucleolo.

Respuesta inflamatoria, en forma de infiltración hemocítica, agrupamiento, y encapsulación puede llegar a ocurrir pero es más bien difusa y no muy conspicua, a menos de que al mismo tiempo se presente una infección bacteriana secundaria.

Existe un tipo único de célula que se presenta con frecuencia en camarones

infectados con YHV y que puede servir como ayuda para el diagnóstico histológico de esta enfermedad. Este tipo de célula se presenta en cantidades muy variables, pero no es del todo rara. Generalmente se le puede observar en los espacios hemales existentes en varios tejidos tales como branquias, glándula antenal, hepatopáncreas, corazón etc.; este tipo de célula es generalmente esférica, presenta citoplasma de apariencia uniforme, pálido basofílico y con un núcleo esférico y central. Es probable que estas células sean en realidad hemocitos inmaduros liberados prematuramente por los órganos hematopoiéticos en respuesta a la hemocitopenia causada por la infección de YHV (ver figures adjuntas).

Es importante tener en cuenta que infecciones severas de WSSV pueden llegar a ocasionar una necrosis del órgano linfoide casi idéntica a la ocasionada por YHV (Pantoja y Lightner 2001). Esta similitud puede ocasionar confusión y resultar en un diagnóstico erróneo de YHV. Sin embargo, en el caso de WSSV dicha necrosis del órgano linfoide es acompañada por la presencia de los cuerpos intranucleares característicos de WSSV. De cualquier manera, si hay razón para sospechar la presencia de YHV en muestras de camarón procedentes de regiones afectadas por WSSV, se debe recurrir a pruebas de hibridación *in situ* (con la sonda para YHV) y/o de RT-PCR para determinar el estatus real de YHV en los animales en cuestión.

3.5.4.2.2 Diagnóstico de YHV usando sondas genéticas

El protocolo para llevar a cabo la hibridación *in situ* con sondas genéticas ya fue descrito en la sección 2.5 y es también explicado en el manual que acompaña a los “kits” o estuches de hibridación *in situ* para YHV distribuidos por DiagXotics. Detalles sobre el diseño de la sonda y su aplicación fueron publicados por Tang y Lightner (1999).

Para preservar las muestras, los camarones deben de ser fijados en solución de Davidson por un período de tiempo no mayor a 48 horas. Una vez cumplido este plazo, las muestras deberán ser inmediatamente transferidas a alcohol etílico al 70%. Si las muestras no pueden ser embebidas en parafina inmediatamente después de la transferencia a alcohol, entonces se deben de llevar a cabo

varios cambios de la solución de etanol al 70% hasta que papel tornasol indique que la solución ya no es ácida. El almacenamiento prolongado en alcohol al 70% ocasiona que la solución de Davidson pase de los tejidos del camarón al alcohol, confiriéndole a éste cierta acidez. El medio ambiente ácido puede contribuir a la destrucción del ARN del virus (en caso de que se encontrara presente) con el consiguiente riesgo de obtener resultados negativos falsos cuando se lleve a cabo la hibridación *in situ*. Como alternativa, se puede fijar a los animales con solución de formalina al 10% neutralizada o con solución de Davidson modificada (fijador R-F; Hasson et al. 1997).

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

YHV

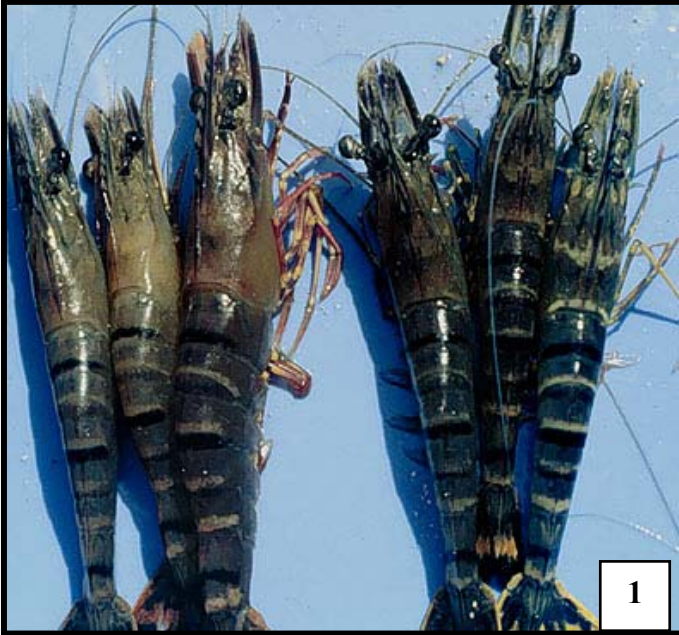


Figura 1. Los tres specimens de *P. monodon* del grupo de la izquierda muestran los signos externos de la enfermedad causada por YHV. Nótese la coloración amarillenta o café-amarillenta del cefalotórax en general, lo cual le dió el nombre a la enfermedad (fotografía cortesía del Dr. T.W. Flegel, Bagok, Tailandia).

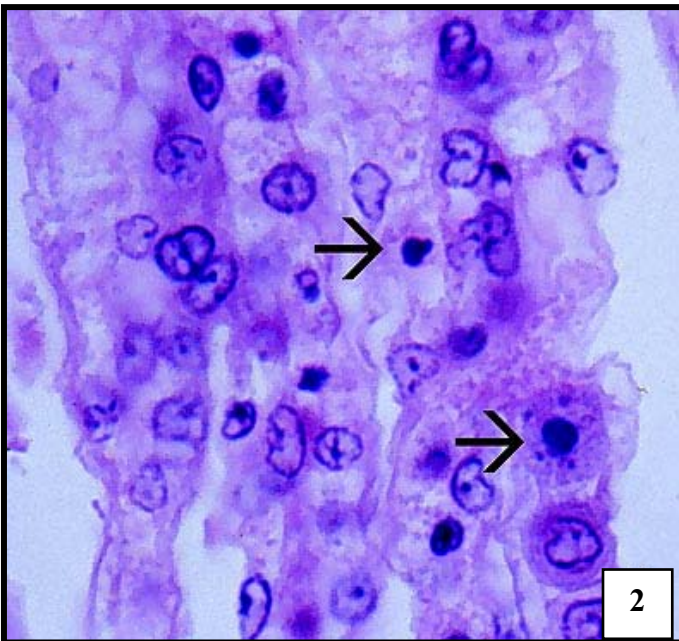


Figura 2. Corte histológico a través de las branquias de un juvenil *P. monodon* infectado por YHV. Se puede observar una necrosis generalizada y difusa en las células de las lamelas branquiales, dentro de las cuales es aparente la presencia de núcleos picnóticos y kariorrécticos (algunos ejemplos son señalados por las flechas). Dentro de las células señaladas también es posible observar un citoplasma bastante basofílico y la presencia de inclusiones citoplasmáticas basofílicas perinucleares. Dichas células son posiblemente hemocitos que han sido liberados prematuramente en respuesta a la hemocitopenia inducida por la infección con YHV. Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 1,000X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

YHV

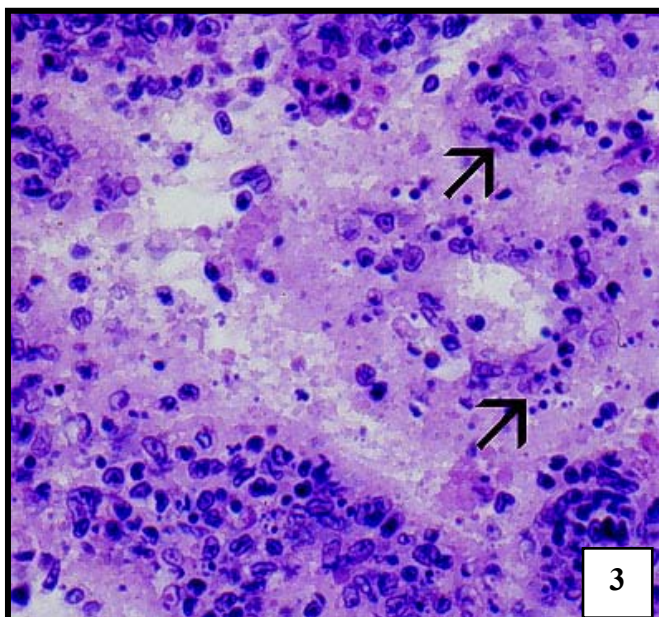


Figura 3. Corte histológico a través del órgano linfoide (OL) de un juvenil *P. monodon* en la fase aguda de infección por YHV. Se puede observar una necrosis generalizada y difusa de las células del OL. Las células afectadas muestran núcleos picnóticos y kariorrécticos. Las flechas señalan algunas células con cuerpos de inclusión citoplasmáticos perinucleares, los cuales varían en coloración de basofílico pálido a oscuro. Esta marcada necrosis durante la fase aguda de la infección por YHV la distingue de TSV que causa lesiones similares en otros tejidos pero no en el OL. Recientemente se ha comprobado que infecciones severas por WSSV pueden causar también este tipo de necrosis en el OL, sin embargo, en el caso de WSSV se

pueden observar los cuerpos de inclusión intranucleares en combinación con la necrosis severa del órgano. La necrosis severa del OL no debe de tomarse por si sola como evidencia concluyente de infección por YHV. Para poder confirmar el diagnóstico de YHV, es necesario llevar a cabo pruebas adicionales (como por ejemplo, hibridación *in situ* con sondas específicas para la detección de YHV o RT-PCR). Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 525X.

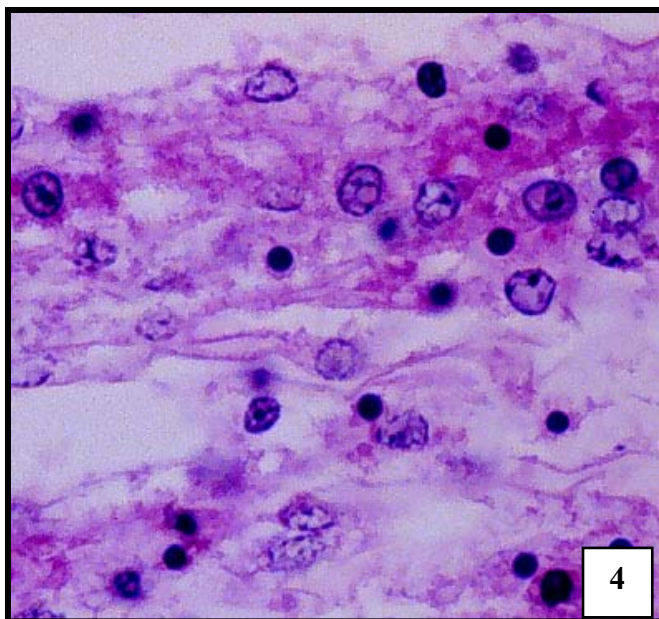


Figura 4. Corte histológico a través de las branquias de un juvenil *P. duorarum* infectado experimentalmente con YHV. Se puede observar una necrosis severa (grado G4), de multifocal a difusa, caracterizada por la presencia de células con un incremento en la eosinofilia del citoplasma y núcleos picnóticos. Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 1,000X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL

YHV

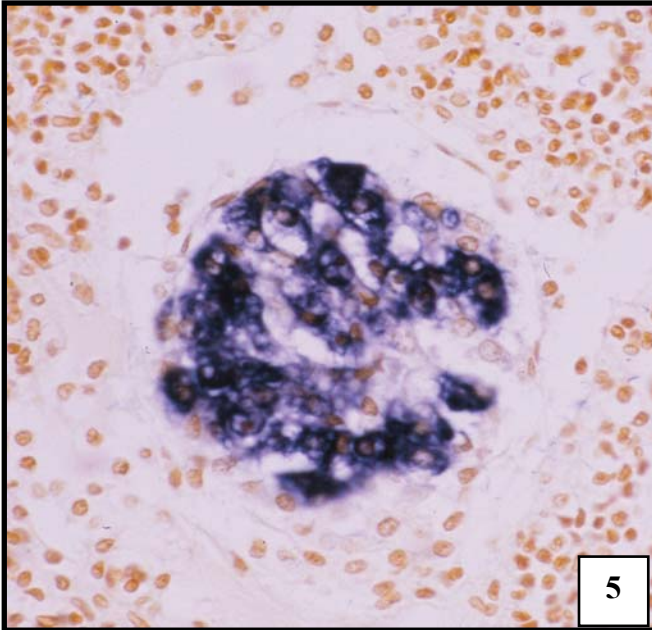


Figura 5. Corte histológico a través del órgano linfoide de un camarón *P. monodon* infectado por YHV. El espécimen fue sujeto a una prueba de hibridación *in situ* con una sonda genética marcada con DIG, específica para la detección del virus de la cabeza amarilla (YHV). Se puede observar una intensa reacción positiva (deposición de un precipitado azul oscuro o negro) a la sonda dentro del citoplasma de las células parenquimales de un esferoide en el órgano linfoide. Aparentemente las estructuras conocidas como “esferoides” del órgano linfoide (EOL) son una respuesta no específica del sistema inmunológico del camarón contra una variedad de agentes patógenos. Además de YHV, se han observado EOLs durante la fase crónica o de recuperación de TSV (ver sección 3.4.4.2) y

también durante algunas enfermedades bacterianas. Los EOL no deben de tomarse como una característica diagnóstica definitiva de ninguna enfermedad. La presencia de EOL debe de ser interpretada dentro del contexto del historial de las muestras y la sospecha de una determinada enfermedad viral debe de ser confirmada por medio de otros métodos, por ejemplo, hibridación *in situ* con la sonda genética apropiada. Tinción: Bismarck Brown y sonda genética marcada con DIG. Magnificación: 100X.

4 ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO.

4.1 Vibriosis.

4.1.1 Nombre de la enfermedad/enfermedades

Vibriosis; en algunas regiones de Latinoamérica a la vibriosis también se le llegó a conocer como el síndrome de la gaviota.

4.1.1.1 Agentes etiológicos.

- *Vibrio* spp. Gram negativo, oxidasa positivo, mótil.
- Las especies que se presentan con mayor frecuencia en laboratorios de producción de postlarvas incluyen: *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, and *Vibrio* sp.
- En instalaciones de crianza y de engorda, las especies que se reportan con mayor frecuencia son: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, and *Vibrio* sp.
- Especies que se reportan sólo ocasionalmente son: *V. damsela*, *V. fluvialis*, and *Vibrio* spp.

4.1.1.2 Métodos preferidos actualmente para el diagnóstico:

- Aislamiento de los organismos a partir de tejidos del camarón.
- Purificación de los organismos usando el medio de cultivo apropiado.
- Identificación utilizando:
 - Método modificado de la API RAPID-NFT.
 - Métodos clásicos empleando indicadores como tolerancia a la sal, reacciones bioquímicas, fermentación de carbohidratos selectos y crecimiento usando ciertos compuestos como la única fuente de carbón.

4.1.2 Rango geográfico y especies afectadas.

4.1.2.1 Rango geográfico

Ampliamente distribuido en instalaciones de cultivo alrededor del mundo; presente con mayor frecuencia en laboratorios de producción de postlarvas, sin embargo las epizootias en estanques de engorda no son del todo raras.

4.1.2.2 Especies afectadas

Cualquier especie de camarón usada en acuicultura puede ser susceptible a la infección si se encuentra bajo condiciones de estrés. Epizootias importantes se han reportado en:

- *P. japonicus* en Japón.
- *P. monodon* en la mayoría de las regiones del Indopacífico en donde se cultiva esta especie.
- *P. vannamei* en Ecuador, Perú, Colombia y Centroamérica.

4.1.3 Síntomas clínicos de importancia diagnóstica.

- Altas mortandades, particularmente en postlarvas y juveniles tempranos.
- Los camarones moribundos se muestran hipóxicos y se acercan con frecuencia a la superficie y a las orillas de los estanques.
- Se puede observar aves marinas alimentándose de los camarones que se acercan a la superficie.
- Camarones luminiscentes en los tanques o estanques.

4.1.4 Diagnóstico de la vibriosis

4.1.4.1 Diagnóstico presuntivo

- Presencia de síntomas clínicos a como se describieron en la Sección 4.1.3.
- Concentraciones altas de bacterias en la hemolinfa (de acuerdo a observaciones de preparaciones en húmedo, frotis de hemolinfa, o examen húmedo directo de larvas o postlarvas con objetivos de 40, 60 o 100x).

4.1.4.2 Diagnóstico histológico (ver Sección 4.2.)

4.1.4.3 Diagnóstico confirmatorio

Se puede llegar a un diagnóstico confirmatorio a través de los procedimientos siguientes:

- Aislamiento de la bacteria a partir de tejidos o hemolinfa del camarón.
- Purificación de la bacteria usando los medios de cultivo apropiados.
- Identificación de la bacteria usando:

- Método modificado de la API RAPID-NFT.
- Métodos clásicos empleando indicadores tales como tolerancia a la sal, reacciones bioquímicas, fermentación de carbohidratos selectos y crecimiento usando ciertos compuestos como la única fuente de carbón.
- Sensitividad a los antibióticos.

Actualmente los métodos serológicos y las sondas genéticas se encuentran en fase de investigación y desarrollo y su distribución a los laboratorios de diagnóstico es muy limitada.

4.1.5 Obtención de muestras para diagnóstico microbiológico en el Laboratorio de Patología Acuicola de la Universidad de Arizona (ver también el apéndice en la página 31).

4.1.5.2 Juveniles

- Desinfectar la superficie sumergiendo a los animales por corto tiempo (10 a 60 segundos) en:
 - Hipoclorito de calcio al 1%.
 - Yodo 1-2% (povidona).
- Enjuagar en agua estéril o en solución salina (NaCl al 2.5%).
- Con la ayuda de instrumentos de disección esterilizados al flameo, remueva la cutícula de uno de los segmentos abdominales o del cefalotórax. Con cuidado extraiga el órgano o una muestra del tejido de interés.
- En el caso de infecciones sistémicas, extraiga una porción del músculo esquelético o del corazón y toque con él la superficie de una placa de agar, disperse con el asa de platino e incube.
- En el caso de infecciones entéricas, extraiga y disecte el hepatopáncreas, intestino, o estómago y asegúrese de que la parte interna del órgano entre en contacto con el agar al momento de hacer la siembra. Disperse con el asa de platino e incube.

4.1.5.3 Animales lo suficientemente grandes para extraer hemolinfa.

- Extraiga la hemolinfa con la ayuda de una jeringa estéril de tuberculina. Es necesario utilizar una jeringa y aguja diferentes para cada camarón. Evite la contaminación cruzada. Coloque una gota de hemolinfa en la placa de agar y dispersela con el asa de platino.
- Un método alternativo consiste en desinfectar una de las antenas con alcohol y luego proceder a cortarla. La gota de hemolinfa que aparece al cortar la antena es sembrada en la placa de agar.
- Si se desea hacer diluciones, se deben de tener listos tubos con 0.9 ml de solución salina (NaCl al 2.5%) o agua de mar estéril. Se agrega entonces 0.1 ml de hemolinfa para (dilución de 1:10). A partir de esta dilución se pueden preparar soluciones más diluidas si se requiere.

4.2 Diagnóstico histopatológico.

4.2.1 Técnicas para el diagnóstico histológico.

4.2.1.1 Técnicas preferidas actualmente.

- Demostración de la presencia de bacterias de forma cilíndrica en las lesiones características de la enfermedad.
- Confirmación del diagnóstico histológico presuntivo utilizando métodos bacteriológicos y/o serológicos.

Con las técnicas histológicas disponibles, es posible hacer un diagnóstico tentativo de la enfermedad. En algunos casos, las lesiones características producidas por ciertas especies de *Vibrio* pueden dar un diagnóstico presuntivo.

El diagnóstico presuntivo debe ser confirmado por medio del aislamiento, cultivo e identificación de la bacteria causante de la enfermedad. También es posible utilizar métodos serológicos con anticuerpos específicos, sondas genéticas y/o PCR (de acuerdo a su disponibilidad en el mercado).

4.2.2 Muestreo, fijación y tinción.

- Seleccione únicamente animales obviamente enfermos o moribundos y que

- muestran signos clínicos distintivos de la enfermedad probablemente bacteriana.
- La solución fijadora preferida para el diagnóstico histológico es la solución de Davidson (AFA: ver sección 2.2).
 - Los especímenes deberán estar vivos al momento de fijarse; si se trata de larvas o postlarvas tempranas, éstas pueden ser fijadas por inmersión pero si se trata de postlarvas tardías, juveniles o adultos, estos deberán de fijarse por inyección e inmersión.
 - Formalina al 10% neutralizada (NBF “neutral buffered formalin”) es aceptable como agente fijador en el caso de larvas y postlarvas, pero en comparación con la solución de Davidson resulta de calidad inferior para otros propósitos.
 - Tinción H&E. Las células bacterianas adquieren generalmente una coloración basofílica pálida.
 - Tinción Gram de Brown y Brenn. Usada en la demostración de bacterias Gram positivas (azules) y Gram negativas (rojas) en cortes de tejidos.
 - Tinciones de Giemsa. Tiñen cualquier tipo de bacteria de color azul oscuro.
 - Tinción ácido-resistente (“Acid Fast”). Usada en la demostración de *Mycobacterium* spp.; con esta tinción, las células de *Mycobacterium* se tiñen de color rojo, mientras que *Vibrio* spp. y otras especies de bacterias se tiñen de color azul.

4.2.3 Lesiones histológicas ocasionadas por la vibriosis.

4.2.3.1 Vibriosis de larvas y postlarvas.

4.2.3.1.1 Información general.

- Algunos de los tipos de vibriosis larvaria y postlarvaria son ocasionados por formas bioluminiscentes de *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*.
- Las infecciones pueden ser de tipo cuticular, entérico o sistémicas.

4.2.3.1.2 Hallazgos histológicos: vibriosis oral y entérica.

- Cuando los estadios larvales o postlarvales del camarón son afectados por formas luminiscentes (y no luminiscentes relacionadas) de vibrio (*V.*

parahaemolyticus, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y posiblemente *V. alginolyticus*) se pueden observar placas basofílicas de bacterias (con tinción H&E) que al ser examinadas a alta magnificación ponen de manifiesto la presencia de masas de bacterias colonizando la cutícula de la región oral y apéndices relacionados, la cutícula del esófago y la cubierta cuticular del estómago y todos sus componentes como por ejemplo, el molino gástrico (ver figuras adjuntas).

- Acompañando a la colonización cuticular de la región oral y del estómago es común observar el redondeamiento y desprendimiento de las células epiteliales que recubren el interior de los túbulos del hepatopáncreas (fenómeno conocido como “bolitas blancas”) (ver figuras adjuntas).
- En general, a la colonización cuticular le sigue la invasión del hepatopáncreas y del intestino y por último infecciones sistémicas durante la fase terminal de la enfermedad.

4.2.3.1.3 Hallazgos histológicos: vibriosis cuticular y de los apéndices.

- Los extremos de los apéndices pueden ser colonizados por vibrio causando necrosis del tejido epitelial, inflamación hemocítica y melanización.
- En casos en los que la colonización e invasión cuticular es severa, la infección puede progresar hasta volverse sistémica.

4.2.3.1.4 Vibriosis del camarón juvenil, subadulto y adulto.

4.2.3.1.4.1 Información general.

- Las bacterias del género vibrio son residentes normales de los ambientes estuarinos y marinos y muchas de ellas se encuentran asociadas al camarón tanto como agentes patógenos como componentes normales de su microflora.
- Infecciones por vibrio generalmente son el resultado de trauma físico, condiciones ambientales extremas, secundarias a infecciones causadas por otros patógenos o por formas altamente virulentas.

4.2.3.1.4.2 Hallazgos histológicos: Vibriosis localizada (lesiones, enfermedad de la concha, enteritis hemocítica, etc.).

- Los focos de infección de vibrio generalmente están bien delimitados por células hemocíticas formando cápsulas o tapones, los cuales comunmente se encuentran melanizados. Las bacterias pueden ser observadas típicamente dentro de o adyacentes a tales lesiones.

Las lesiones de este tipo pueden ser debidas a:

- infección de laceraciones, raspones o heridas causadas por objetos punzantes.
- infección bacteriana secundaria de la concha como resultado de condiciones ambientales extremas o toxicidad química.
- infección bacteriana secundaria como resultado de la pérdida del epitelio de la mucosa intestinal, del ciego medio anterior o del hepatopáncreas causado por enteritis hemocítica (EH).
- abscesos focales dentro del hepatopáncreas causados por parásitos, infecciones virales o por causas desconocidas.

4.2.3.1.4.3 Hallazgos histológicos: vibriosis sistémica.

- La vibriosis sistémica también es conocida como el Síndrome de la gaviota ("sea gull syndrome") en áreas en donde se cultiva principalmente *P. vannamei*.
- Las especies de vibrio involucradas con mayor frecuencia son:
 - *V. parahaemolyticus*
 - *V. vulnificus* / *V. harveyi*
- La característica diagnóstica principal de la vibriosis sistémica es la presencia multifocal de nódulos hemocíticos con centros sépticos, los cuales pueden o no estar melanizados.
- Dichos nódulos se pueden observar con frecuencia dentro del órgano linfoide, el corazón y las branquias, pero de la misma manera no es raro encontrarlos en espacios del hemoceloma y en el tejido conectivo esponjoso en cualquier parte del cuerpo del camarón.

4.2.3.1.4.4 Hallazgos histológicos: Hepatopancreatitis séptica

- El síndrome de la hepatopancreatitis séptica ("Septic hepatopancreatitis syndrome"; SHPS) es una enfermedad bastante importante de *P. monodon* cultivado en sistemas intensivos de la región del Indopacífico.
- La "enfermedad roja" a como se le conoce comunmente a este síndrome debido a la expansión de los cromatóforos rojos y la contracción y disminución de otros pigmentos, es una expresión del estrés tan severo por el cual pasan algunos de estos camarones durante la fase terminal de la enfermedad. La enfermedad roja es también una expresión clínica de la infección por el virus del síndrome de la mancha blanca (ver Sección 3.1).
- Algunos reportes han relacionado al síndrome de la hepatopancreatitis séptica (SHPS), con el uso de alimentos rancios o con hongos. La similitud entre las lesiones del SHPS y las causadas por la aflatoxicosis, apoya esta teoría.
- Independientemente de que el SHPS sea causado por un patógeno primario o por una toxina, el síndrome tiene una fase séptica durante la cual *Vibrio* spp., y frecuentemente *V. harveyi*, se encuentran entre las cepas dominantes.
- El tipo de lesión principal, observable por medio de histología, es una atrofia generalizada del hepatopáncreas, acompañada de necrosis multifocal e inflamación hemocítica de los túbulos la cual procede de la región apical a la región proximal según el síndrome se desarrolla.
 - La porción proximal de los túbulos se puede volver severamente inflamada por los hemocitos y melanizada, mientras que los extremos distales de los túbulos se observan relativamente sin afectar.
 - En cortes histológicos teñidos con H&E la presencia de colonias de *Vibrio* spp. y otras bacterias son una característica prominente. Las colonias de bacterias se observan como masas basofílicas pálidas localizadas en los restos de tejido necrótico dentro de los lúmenes de los túbulos y en las paredes de los túbulos necróticos e inflamados.

ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO

VIBRIOSIS



Figura 1. Postlarva (PL) de *P. stylirostris* con vibriosis. La necrosis en varios apéndices (pleopodos y pereiopodos) ha sido puesta de manifiesto por los focos de melanización en las puntas de los mismos. El obscurecimiento de la región bucal sugiere la posibilidad de colonización bacteriana de la cutícula del esófago y de los apéndices bucales. Tinción: Preparación en húmedo sin teñir. Magnificación: 50X.

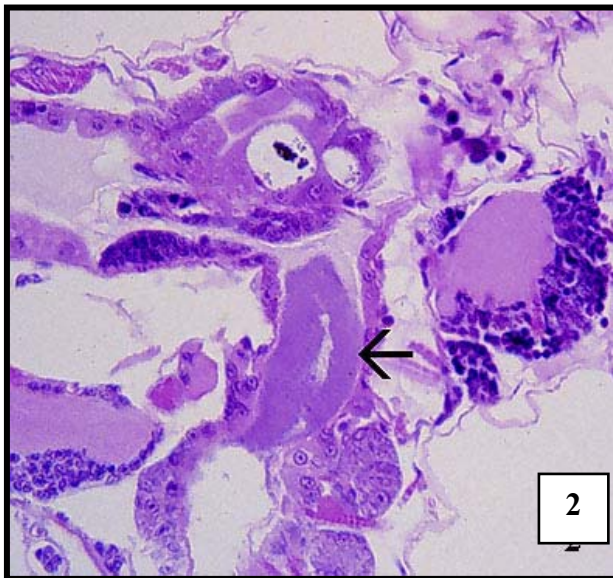


Figura 2. Corte sagital medio a través de una postlarva de *P. vannamei* mostrando una gruesa placa bacteriana de *Vibrio* sp. la cual se encuentra colonizando en la cutícula del esófago. La colonia de bacterias se observa en esta preparación como una masa basofílica amorfa en la superficie de la cutícula del esófago (flecha). Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación 350X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO

VIBRIOSIS

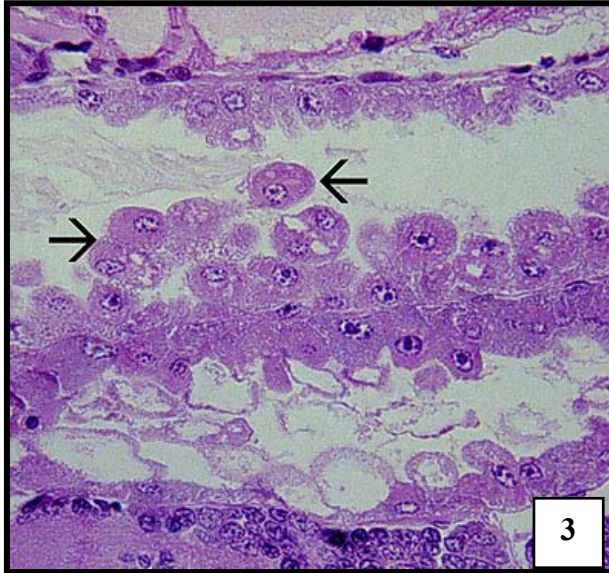


Figura 3 Corte histológico de una postlarva de *P. vannamei* a la altura del plano longitudinal medio. Este espécimen también presentaba colonización bacteriana (probablemente *Vibrio* spp.) en forma de placas en los apéndices bucales y en el esófago. El área que se muestra en esta fotografía corresponde al hepatopáncreas e intestino medio, dentro del cual se observa la presencia de “bolitas blancas” (ejemplos señalados por las flechas). Dichas “bolitas blancas” son realmente células epiteliales de los tubules del hepato-páncreas o de la misma mucosa intestinal, las cuales se han desprendido de los lúmenes a causa de las toxinas liberadas por la placa bacteriana en la región bucal. Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 600X.

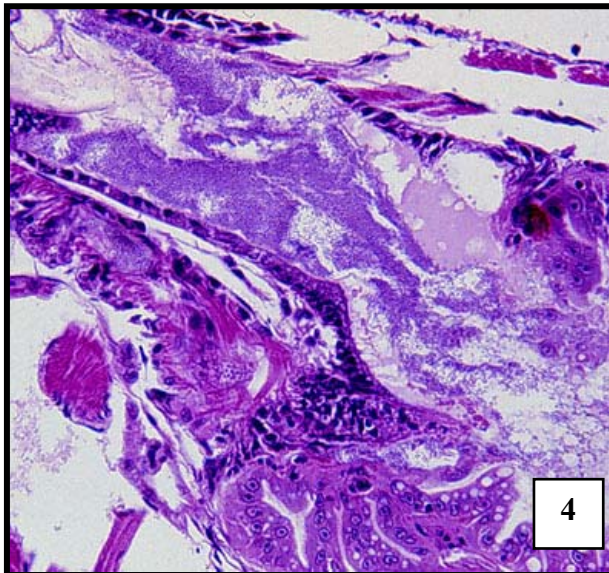


Figura 4. Corte histológico medio-sagital de una postlarva de *P. monodon* en un estadio más avanzado de colonización del tracto digestivo (región bucal, esófago, estómago, hepatopáncreas e intestino medio) por *Vibrio* sp. Se pueden observar abundantes masas de bacterias (bacilos de color azul cuando se usa tinción de H&E) en el lumen del intestino así como en las superficies del estómago y del hepatopáncreas. Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 300X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO

VIBRIOSIS

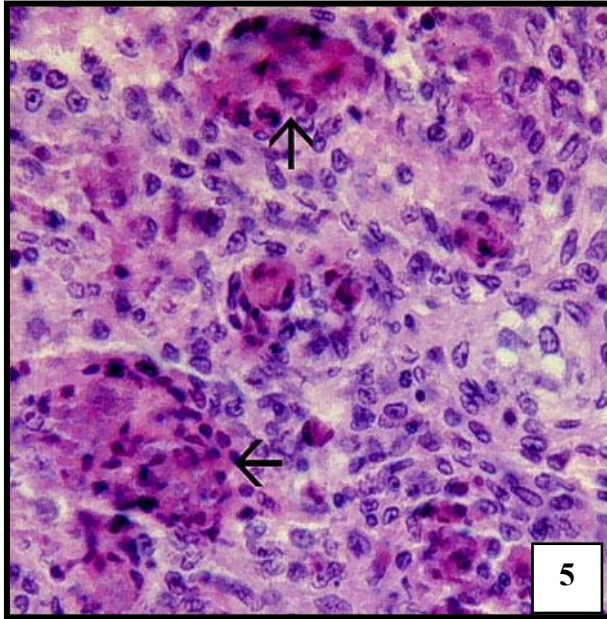


Figura 5. Corte histológico a la altura del plano sagital medio de un juvenil *P. vannamei* con infección sistémica de *Vibrio parahaemolyticus*. La fotografía muestra una porción del órgano linfoide en donde se observa una multitud de nódulos hemocíticos, algunos de los cuales se encuentran melanizados (ejemplos son señalados con flechas). Los nódulos hemocíticos son una respuesta del sistema inmunológico del camarón por medio de la cual se intenta encapsular y destruir a las bacterias concentradas dentro del órgano. En la parte central de algunos de estos nódulos se pueden observar microcolonias de bacterias, las cuales aparecen como pequeños agregados basofílicos. Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 600X.

4.2 Hepatopancreatitis necrotizante (“Necrotizing Hepatopancreatitis”; NHP)

4.2.1 Nombre de la enfermedad y agente etiológico.

Hepatopancreatitis necrotizante (NHP); es posible que existan múltiples variantes geográficas de NHP.

Otros nombres con los que se le conoce a este síndrome:

- Hepatopancreatitis necrotizante de Texas (TNHP).
- Síndrome Texano de la mortandad en los estanques (TPMS).
- Heparopancreatitis necrotizante del Perú.

4.2.1.1 Agente

La posición taxonómica del agente causante de NHP ha sido determinada recientemente y se cree que la bacteria representa un nuevo género dentro de las alfa Proteobacterias (Frelier et al. 1994).

La bacteria causante de NHP es una bacteria pequeña, Gram negativa, altamente pleomórfica, y aparentemente un parásito intracelular obligado que infecta las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas. Dentro de las células infectadas por NHP, se presentan dos variantes morfológicamente distintas de la bacteria del NHP:

1) una forma de bacilo, similar a las rickettsias verdaderas, los cuales miden 0.3 μm x 9 μm . Esta forma de bacilo carece de flagelos.

2) una forma helicoidal que mide de 0.2 μm x 2.6 a 2.9 μm . La forma helicoidal posee ocho flagelos en el ápice basal de la bacteria y un flagelo adicional (o posiblemente dos) en la cresta de la hélix.

Los análisis por medio de microscopía electrónica de transmisión (“transmission electron microscopy”; TEM) han demostrado que el NHP de Texas y el de Perú son bastante similares morfológicamente, si no es que idénticos.

Los análisis a nivel genómico que se han llevado a cabo en la Universidad de Texas A&M sugieren que todas las cepas

geográficas de NHP que han sido examinadas están muy relacionadas entre sí. (Frelier et al. 1994).

4.2.1.2 Métodos de diagnóstico preferidos actualmente:

- Análisis histopatológico del hepatopáncreas mostrando atrofia del órgano, lesiones granulomatosas y la presencia de cantidades masivas de bacterias muy pequeñas, intracelulares y Gram negativas, dentro de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas.
- Método de tinción de Steiner modificado demostrando la presencia de masas de bacterias intracelulares y/o libres en el lumen de los túbulos del hepatopáncreas.
- Hibridación *in situ* o en “dot-blot” con sondas genéticas específicas para la detección de NHP (disponibles a través de DiagXotics, Inc.).
- Demostración de la presencia de bacterias NHP por medio de TEM en camarones con lesiones granulomatosas en el hepatopáncreas.

4.2.2 Rango geográfico y especies afectadas.

4.2.2.1 Rango geográfico.

NHP fue reconocido por primera vez en camarones peneidos cultivados en Texas.

Reportes de epizootias causadas por bacterias NHP similares, si no es que idénticas, se han originado en granjas de camarones peneidos ubicadas en Perú, Ecuador, Venezuela, Brazil, Panamá y Costa Rica.

4.2.2.2 Especies afectadas.

Hasta este momento las infecciones de NHP han sido reportadas únicamente en camarones peneidos americanos.

NHP ha sido reconocido en *P. vannamei*, *P. aztecus*, *P. setiferus*, *P. stylirostris* y *P. californiensis*.

4.2.3 Síntomas clínicos de importancia diagnóstica.

4.2.3.1 Síntomas externos de NHP.

Los síntomas externos que se pueden observar en los camarones enfermos pueden incluir combinaciones de los siguientes:

- Consumo reducido de alimento, anorexia, e intestinos vacíos.
- Factores de conversión alimenticia muy elevados.
- Marcada reducción del crecimiento.
- Proporción longitud:peso muy elevada (“colas delgadas”).
- Cutícula blanda y cuerpos flácidos.
- Branquias oscuras o negras.
- Expansión de cromatóforos en las orillas o puntas de los pleópodos o urópodos dándoles una apariencia oscura.
- Colonización severa de las superficies por organismos epicomensales.
- Enfermedad bacteriana de la concha (lesiones melanizadas de los apéndices o lesiones ulcerativas del caparazón).
- Letargia.
- Marcada atrofia del hepatopáncreas mostrando uno o más de los siguientes:
 - Centro “blanquecino” pálido en lugar del color anaranjado normal.
 - Color pálido acompañado de vetas negruzcas (túbulos melanizados).
 - Consistencia blanda y acuosa (edematoso); con fluido en el centro.
- Tasas de mortandad elevadas que, si no se hace nada por tratar el problema, pueden llegar a alcanzar más del 90% en un plazo de 30 días desde el momento en que se aparecen los primeros síntomas.

4.2.3.2 Factores ambientales.

La temperatura y la salinidad son dos factores ambientales que tal vez jueguen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

Estudios epizootiológicos llevados a cabo en Texas mostraron que las epizootias de esta enfermedad son precedidas por períodos prolongados de temperaturas altas (> 29°C a 31°C) y salinidades altas (20 ppt a 40 ppt).

En 1993, características ambientales similares de temperaturas altas (> 29°C and up to 35°C) y salinidades elevadas (> 20 ppt to 38 ppt) por períodos de varias semanas precedieron a la epizootia de NHP en

Tumbes, Peru. Características ambientales muy parecidas precedieron en 1993, 1994 y 1995 a las epizootias de NHP en Venezuela, Brazil, Ecuador, Costa Rica y Panamá.

4.2.4 Procedimientos para el diagnóstico.

4.2.4.1 Preparaciones de hepatopáncreas en húmedo.

- Preparaciones en húmedo, hechas a partir de hepatopáncreas de camarones con infección de NHP temprana o avanzada pueden mostrar los siguientes signos de significancia diagnóstica:
 - Reducción o ausencia completa de gotas de lípidos.
 - Presencia de túbulos melanizados en cantidades variables.
- La presencia de estos signos puede ser de utilidad para formular un diagnóstico tentativo de NHP cuando las condiciones ambientales son las apropiadas para que la enfermedad se presente (sección 4.3.3.2) y si han habido casos previos de NHP en la región.

4.2.4.2 Histopatología.

- Demostración histológica de atrofia hepatopancreática; atrofia moderada a severa de la mucosa de los túbulos del hepatopáncreas; lesiones granulomatosas multifocales dentro del hepatopáncreas afectando uno o más túbulos.
- Las células epiteliales de los túbulos adyacentes a los focos de lesiones granulomatosas se encuentran típicamente atrofiadas y reducidas morfológicamente de ser un epitelio columnar simple a uno cuboidal; las células atrofiadas se presentan con muy pocas vacuolas de lípidos (en las células “R”) y un número marcadamente reducido o totalmente ausente de vacuolas secretoras (en las células “B”).
- Las células epiteliales que se encuentran dentro de los focos granulomatosos pueden estar hipertrofiadas y contener, libres en el citoplasma, masas de bacterias pálidamente basofílicas, Gram negativas. El núcleo de las células atrofiadas puede tener una apariencia normal o bien puede aparecer piknótico.
- Tinciones especiales tales como la de Giemsa y especialmente el método

modificado de Steiner para la tinción de plata, son de gran ayuda en la demostración de las formas de bacilos y helicoidales con el microscopio compuesto.

- Cuando los animales se encuentran severamente afectados por NHP, es común que se presenten infecciones bacterianas secundarias, principalmente por *Vibrio* spp., dentro de los túbulos del hepatopáncreas, las cuales pueden llegar a volverse sistémicas.

4.2.4.3 Uso de sondas genéticas para la detección de NHP.

En la Universidad de Texas A&M se desarrolló una sonda genética no radioactiva, marcada con DIG, específica para la detección de NHP. Los estuches o “kits” de esta sonda están disponibles en el mercado a través de DiagXotics, Inc.

- Hibridación *in situ*: cuando es utilizada en ensayos de hibridación *in situ*, la sonda provee un nivel excelente de sensibilidad diagnóstica.
- Hibridación en formato de punto-mancha (“dot-blot”): algunas substancias presentes en el hepatopáncreas y en las heces fecales pueden interferir con el ensayo y originar resultados positivos falsos cuando la sonda genética se utiliza en ensayos de tipo “dot-blot”. Debido a esto, todavía no es posible encontrar en el mercado métodos rápidos de “dot-blot” para la detección del agente causante de NHP.

ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO

HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE (NHP)



Figura 1. Juvenil moribundo de *Penaeus vannamei* con NHP. Los cromatóforos negros en los extremos de los pleópodos se encuentran expandidos dándoles una falsa apariencia de melanización o de “ensuciamiento” por epicomensales.



Figura 2. Juvenil moribundo de *P. vannamei* con NHP. Para poner de manifiesto el hepatopáncreas se ha removido parte del caparazón y de los tejidos adyacentes. Se puede observar una marcada atrofia del hepatopáncreas, cuyo volumen se encuentra reducido a aproximadamente 50% de lo normal. Aunque difícil de ilustrar con fotografías, tanto en el espécimen de la Figura 1 como el de esta fotografía, la presencia de una cutícula muy suave le imparte cierta flacidez al cuerpo del camarón, lo cual es también una de las características de los camarones moribundos con NHP.

ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO

HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE (NHP)

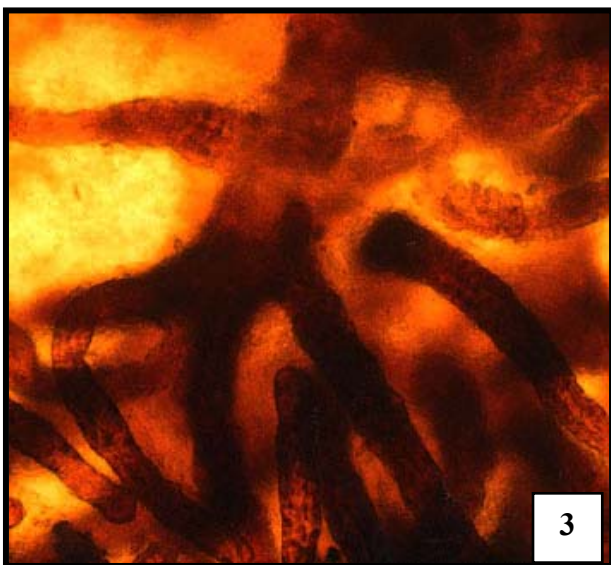


Figura 3. Preparación en húmedo del hepatopáncreas de un camarón con NHP en donde los túbulos se encuentran inflamados y melanizados (porciones más oscuras de los túbulos). Asimismo, se puede observar una ausencia completa de gotas de lípidos. En lugares en donde existan antecedentes de la enfermedad de NHP, estas características proveen un diagnóstico tentativo de NHP. Tinción: preparación en húmedo sin tinción. Magnificación: aproximadamente 150X.

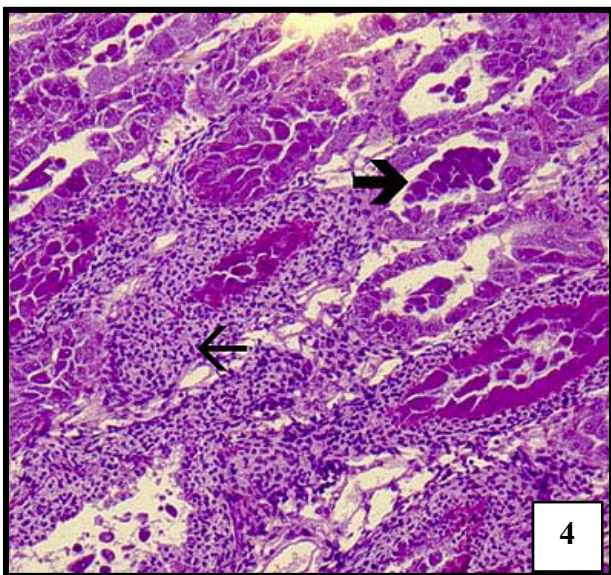


Figura 4. Corte histológico del hepatopáncreas de un juvenil de *P. vannamei* con infección severa (grado G4) por NHP. Es evidente la inflamación hemocítica severa acompañada de melanización (ejemplo señalado con la flecha delgada) en respuesta a la necrosis, citólisis y desprendimiento de células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas (ejemplo señalado con la flecha gruesa). Estos son algunos de los principales cambios ocasionados por NHP a nivel histopatológico. Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 150X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO

HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE (NHP)

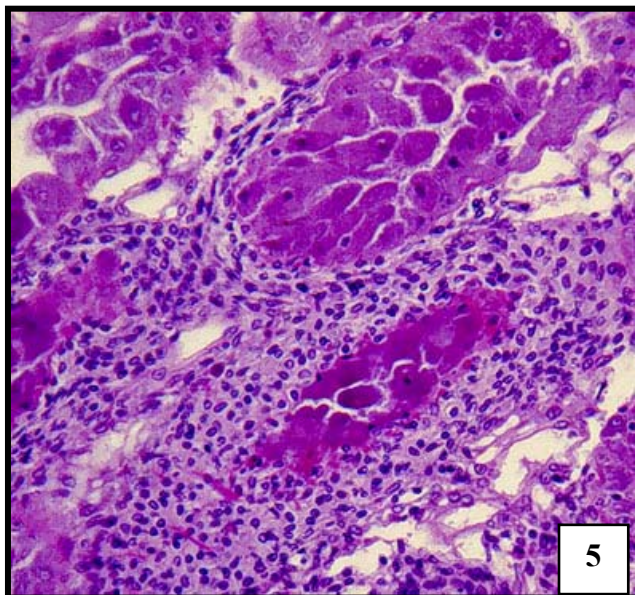


Figura 5. Microfotografía a mayor aumento de una porción del hepatopáncreas mostrado en la Figura 4. Se puede observar la severa infiltración hemocítica entre los túbulos del hepatopáncreas así como también el desprendimiento de las células epiteliales que recubren el interior de los mismos. Nótese la ausencia de vacuolas secretoras y de lípidos dentro de las células epiteliales. Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 300X.

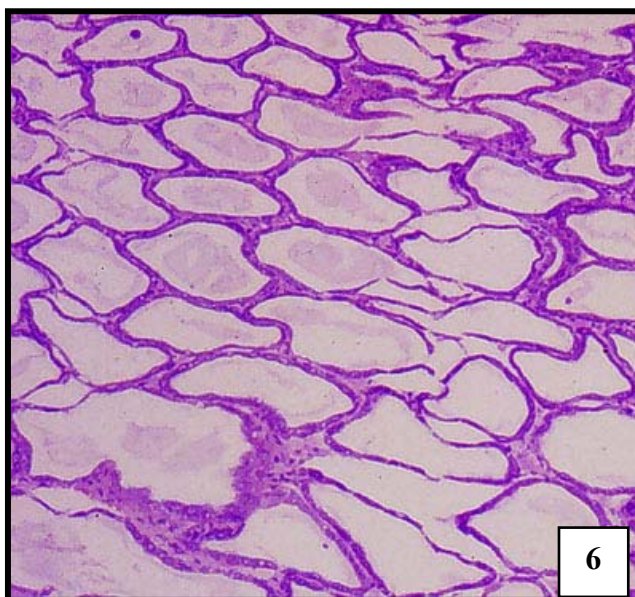


Figura 6. Microfotografía a bajo aumento del hepatopáncreas de un juvenil *P. vannamei* con NHP crónico en grado severo. Se puede observar que el epitelio de los túbulos del hepatopáncreas se encuentra bastante atrofiado resultando en la formación de áreas edematosas (llenas de fluido o "acuosas") extensas. Tinción: H&E de Mayer-Bennett. Magnificación: 100X.

ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO

HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE (NHP)

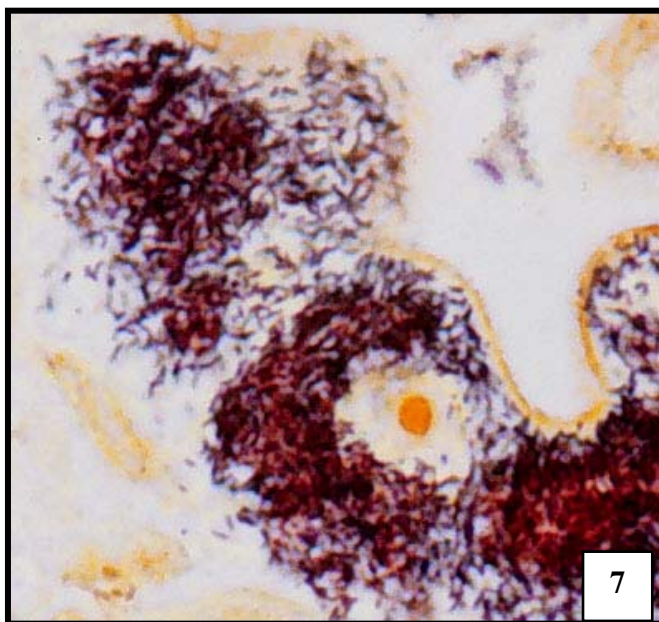


Figura 7. Corte histológico a través del hepatopáncreas de un juvenil *P. vannamei* con NHP. Se pueden observar las masas intracitoplasmáticas (de color café oscuro) de la bacteria causante de NHP, las cuales han sido teñidas con plata a través del método modificado de Steiner. Los núcleos así como las células no afectada aparecen de un color café pálido o amarillo. Tinción: tinción modificada de Steiner. Magnificación: 1,600X.

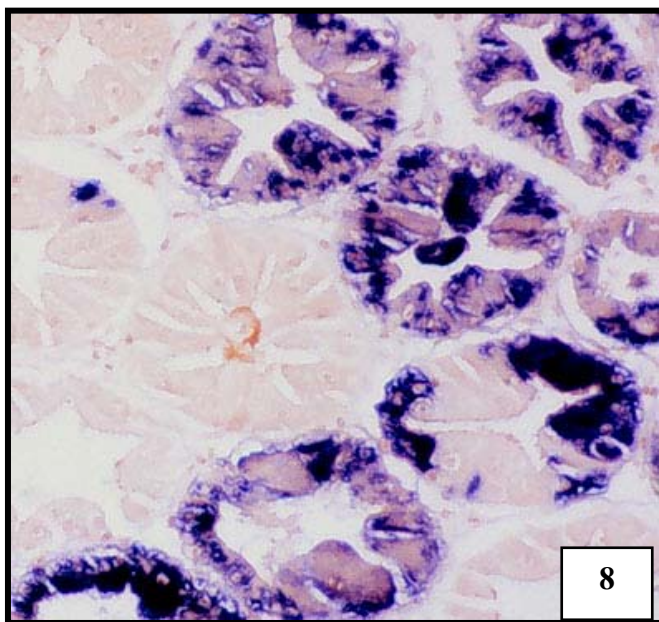


Figura 8. Microfotografía a bajo aumento de una porción del hepatopáncreas de un juvenil *P. vannamei* con NHP. El espécimen fue sometido a una prueba de hibridación *in situ* con una sonda genética marcada con DIG y específica para la detección de NHP. Las masas intracitoplasmáticas de bacterias se tiñen de color azul o azul-negro al reaccionar con la sonda. Las células normales así como los núcleos toman solamente la coloración amarillenta de la tinción de contraste. Tinción: Bismarck Brown y sonda genética marcada con DIG. Magnificación: 250X.

5 CITAS BIBLIOGRÁFICAS

5.1 Referencias generales importantes.

Adams, J.R., and J.R. Bonami (eds.). 1991. Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press, Boca Raton, FL.

Bell, T.A., and D.V. Lightner. 1987. An outline of penaeid shrimp culture methods including infectious disease problems and priority drug treatments. *Veterinary and Human Toxicology* 29: 37-43.

Bell, T.A., and D.V. Lightner. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. Special Publication of The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Brock, J.A., and D.V. Lightner. 1990. Diseases of Crustacea. Diseases Caused by Microorganisms. pp. 245-349. In: O. Kinne (ed.), Diseases of Marine Animals, Vol. III. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany.

Brock, J.A., and K. Main. 1994. A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, HI. 241 p.

Lightner, D.V., and R.M. Redman. 1991. Hosts, geographic range and diagnostic procedures for the penaeid virus diseases of concern to shrimp culturists in the Americas. pp. 173-196. In: P. DeLoach, W.J. Dougherty and M.A. Davidson (eds.), *Frontiers of Shrimp Research*, Elsevier, Amsterdam.

Lightner, D.V. 1993. Diseases of penaeid shrimp. In: J.P. McVey (ed.) *CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Wyban, J.A., J.S. Swingle, J.N. Sweeney, and G.D. Pruder. 1992. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei*. pp. 254-260. In: J. Wyban (ed.) *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA.

5.2 Métodos

5.2.1 Histología.

Clark, G. (ed.) 1981. *Staining Procedures*. 4th Edition. Publ. for the Biological Stain Commission by Williams & Wilkins, Baltimore.

Kiernan, J.A. 1990. *Histological & Histochemical Methods: Theory & Practice*. 2nd Edition. Pergamon Press, Oxford.

Sheehan, D.C., and B.B. Hrapchak. 1980. *Theory and Practice of Histotechnology*. 2nd Edition. C.V. Mosby Co., St. Louis, MO.

Thompson, S.W. 1966. *Selected histochemical and Histopathological Methods*. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, IL.

5.2.2 Sondas genéticas

Genius™ System User's Guide for Membrane Hybridization. Version 3.0. Boehringer Mannheim Corporation, Biochemical Products, 9115 Hague Road, P.O. Box 50414, Indianapolis, IN 46250, USA. pp. 1-99.

Bonami, J.R., L.D. Bruce, B.T. Poulos, J. Mari and D.V. Lightner. 1995. Partial characterization and cloning of the genome of PvSNPV (=BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:59-66.

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

Mari, J., J.R. Bonami and D. Lightner. 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. General Virology* 74:2637-2643.

5.2.3 Hibridación *in situ*.

Bruce, L.D., R.M. Redman, D.V. Lightner and 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.

Hasson K.W., J. Hasson, H. Aubert, R.M. Redman, D.V. Lightner. 1997. A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, 66, 227-236.

Loy, J.K., F.E. Dewhirst, W.D. Weber, P.F. Frelier, T. Garber, S. Taska and J.W. Templeton. In press. Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J Vet Diagnostic Investigation*.

Mari, J., J.R. Bonami and D. Lightner. 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. General Virology* 74:2637-2643.

Mari, J., D.V. Lightner, B.T. Poulos and J.R. Bonami. 1995. Partial cloning of an unusual shrimp parvovirus (HPV): use of gene probes in disease diagnosis. *Diseases of Aquatic Organisms* 22:129-134.

Nunan, L.M. and D.V. Lightner. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV) *J. Virological Methods* 63: 193-201.

Tang, K.F. and D.V. Lightner. 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms* 33:165-173.

5.2.4 PCR y RT-PCR

Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.). 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. Berkeley, CA. 425 pp.

Loy, J.K., P.F. Frelier, P. Varner and J.W. Templeton. 1997. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*.

Nunan, L.M., B.T. Poulos and 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., B.T. Poulos and D.V. Lightner. 2000. Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Marine Biotechnology* 2:319-328.

Pantoja, C.R. and D.V. Lightner. 2000. A non-destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 39:177-182.

5.3 Enfermedades virales

5.3.1 IHNV

Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1984. IHNV virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 38: 185-194.

Bell, T.A., D.V. Lightner, and J.A. Brock. 1990. A biopsy procedure for the non-destructive determination of IHNV virus infection in *Penaeus vannamei*. *J. Aquatic Animal Health* 2: 151-153.

Kalagayan, G., D. Godin, R. Kanna, G. Hagino, J. Sweeney, J. Wyban, and J. Brock. 1991. IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.* 22: 235-243.

Lightner, D.V. 1983. Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. pp. 289-320. In: J.P. McVey (ed.), *CRC Handbook of Mariculture*. Vol. 1. Crustacean Aquaculture. CRC Press, Boca Raton, FL.

Lightner, D.V., Redman, R.M., and Bell, T.A. 1983. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.* 42: 62-70.

Mari, J., J.R. Bonami, and D.V. Lightner.

1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. General Virology* 74: 2637-2643. Owens, L., I.G.

5.3.2 HPV

Bonami, J.R., J. Mari, B.T. Poulos, and D.V. Lightner. 1995. Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. *J. General Virology* 76: 813-817.

Lightner, D.V. and R.M. Redman. 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 45: 47-53.

Lightner, D.V., R.M. Redman, T.A. Bell, and R.B. Thurman. 1992. Geographic dispersion of the viruses IHNV, MBV, and HPV as a consequence of transfers and introductions of penaeid shrimp to new regions for aquaculture purposes. pp. 155-173. In A. Rosenfield and R. Mann (eds.), *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*. Maryland Sea Grant College, UM-SG-TS-92-01, College Park, MD.

Lightner, D.V., R.M. Redman, D.W. Moore, and M.A. Park. 1993. Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 116: 15-23.

Mari, J., D.V. Lightner, B.T. Poulos, and 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.

5.3.3 WSSV

Chow, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang, and C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:165-173.

Lo, C.F., C.H. Ho, S.E. Peng, C.H. Chen, H.C. Hsu, Y.L. Chiu, C.F. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, C.H. Wang and G.H. Kou. 1996.

White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms* 27:215-225.

Poulos, B.T., C.R. Pantoja, D. Bradley-Dunlop, J. Aguilar and D.V. Lightner. "In Press". Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*.

Pantoja, C.R. and D.V. Lightner. 2001. Necrosis due to WSSV can mimic YHV lesions in the lymphoid organ of penaeid shrimp. *Global Aquaculture Advocate* Vol.4, 3:15.

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

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

5.3.4 BP

Bonami, J.R., L.D. Bruce, B.T. Poulos, J. Mari, and D.V. Lightner. 1995. Partial characterization and cloning of the genome of PvSNPV (= BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23: 59-66.

Bruce, L.D., B.B. Trumper, and D.V. Lightner. 1991. Methods of viral isolation and DNA extraction for a penaeid shrimp baculovirus. *J. Virological Methods* 34: 245-254.

Bruce, L.D., R.M. Redman, D.V. Lightner, and 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.

Lightner, D.V., B.T. Poulos, L. Bruce, R.M. Redman, L. Nunan, C. Pantoja, J. Mari, and J. R. Bonami. 1994. Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHNV and HPV, and the baculoviruses MBV and BP. *U.S. Marine Shrimp Farming Program 10th Anniversary Review, Gulf Coast Research Laboratory Special Publication*. Ocean Springs, Mississippi: Gulf Research Reports. No. 1, pp. 59-85.

Overstreet, R.M., K.C. Stuck, R.A. Krol, and W.E. Hawkins. 1988. Experimental infections with *Baculovirus penaei* in the white shrimp *Penaeus vannamei* as a bioassay. *J. World Aquaculture Society* 19: 175-187.

5.3.5 TSV

Brock, J.A., R. Gose, D.V. Lightner and K.W. Hasson. 1995. An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In: *Swimming through troubled water*, Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture '95 (C.L. Browdy & J.S. Hopkins, eds.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 84-94.

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

Hasson K.W., J. Hasson, H. Aubert, R.M. Redman, D.V. Lightner. 1997. A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, 66, 227-236.

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

Lightner, D.V., R.M. Redman, K.W. Hasson and C.R. Pantoja. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Diseases of Aquatic Organisms* 21: 53-59.

Rosenberry, B. (ed.). 1993. Taura syndrome hits farms in Ecuador -- Again. *Shrimp News International*. 18(3): 6.

Rosenberry, B. (ed.). 1994a. Update on Taura syndrome in Ecuador. *Shrimp News International*. 19(3): 2-4.

Rosenberry, B. (ed.). 1994b. Taura syndrome ravages Ecuador. *Shrimp News International*. 19(5): 10-12.

Wigglesworth, J. 1994. 'Taura Syndrome' hits Ecuador farms. *Fish Farmer* 17(3): 30-31.

5.3.6 YHV

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

Loh P.C., E. Cesar, B. Jr. Nadala, L.M. Tapay and Y. Lu. 1998. Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. In: *Advances in Shrimp Biotechnology*, Flegel T.W., ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 225-259.

Lu, Y., L.M. Tapay, P.C. Loh, J.A. Brock, and R.B. Gose. 1995. Distribution of yellow-head virus in selected tissues and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23: 67-70.

Wongteerasupaya, C., S. Sriurairatana, J.E. Vickers, A. Akrajarnorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnjul, and T.W. Flegel. 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 22: 45-50.

5.4 Enfermedades bacterianas

5.4.1 Vibriosis

Mohney, L.L., D.V. Lightner, and T.A. Bell. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *J. World Aquaculture Society* 25: 116-125.

Lightner, D.V., and D.H. Lewis. 1975. A septic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Marine Fisheries Review* 37: 25-28.

Vanderzant, C., R. Nickelson, and P.W. Judkins. 1971. Microbial flora of pond-reared shrimp (*Penaeus aztecus*). *Applied Microbiology* 21: 916-921.

5.4.2 NHP

Frelier, P.F., R.F. Sis, T.A. Bell, and D.H. Lewis. 1992. Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Texas cultured shrimp (*Penaeus vannamei*). *Veterinary Pathology* 29: 269-277.

Frelier, P.F., J.K. Loy, B. Kruppenbach. 1993. Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebrate Pathology* 61: 44-48.

Krol, R.M., W.E. Hawkins, and R.M. Overstreet. 1991. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Invertebrate Pathology* 57: 362-370.

Loy, J.K., P.F. Frelier, P. Varner and J.W. Templeton. 1996. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *J. World Aquaculture Society* 25:117-122.

Lightner, D.V., R.M. Redman, and J.R. Bonami. 1992. Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Diseases of Aquatic Organisms* 13: 235-239.

