

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

DETERMINACIÓN DE DOS FORMAS DEL VIRUS DE LA NECROSIS  
HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA EN CAMARÓN  
BLANCO *Litopenaeus vannamei* EN GUASAVE, SINALOA

PRESENTA  
Q.B.P. CLAUDIA RAMÍREZ ALMARAZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

GRAL. ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO,      OCTUBRE 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS

DETERMINACIÓN DE DOS FORMAS DEL VIRUS DE LA NECROSIS  
HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA EN CAMARÓN  
BLANCO *Litopenaeus vannamei* EN GUASAVE, SINALOA

PRESENTA  
Q.B.P. CLAUDIA RAMÍREZ ALMARAZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

OCTUBRE 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**DETERMINACIÓN DE DOS FORMAS DEL VIRUS DE LA NECROSIS  
HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA EN CAMARÓN BLANCO**  
*Litopenaeus vannamei* EN GUASAVE, SINALOA

**Aprobación de tesis por el comité particular de**  
**Q.B.P. Claudia Ramírez Almaraz**

---

**Dr. Juan José Zárate Ramos**  
**Director de Tesis**

---

**Dra. Diana Elisa Zamora Ávila**  
**Co-Directora**

---

**Dr. Fernando Jiménez Guzmán**  
**Asesor Externo**

## **DEDICATORIA**

A mi madre, a quien amo profundamente, porque su apoyo fue primordial para la culminación de mi trabajo.

A mi esposo Eduardo, por interminables momentos de alegría y soporte, por apoyarme, animarme y seguirme la corriente en cualquier momento desde los más descabellados hasta los más profesionales. Gracias por aguantar mis hormonas. Te amo infinitamente.

A mis hijas, Alejandra y Sara, mis eternas pequeñas, no se dan cuenta de la energía que me emanan con solo pensarlas, espero llegar a ser lo que esperan. Son mi pedazo de sueño dulce en medio de esta realidad.

A mis hermanos, con mención especial para Paco, su apoyo fue sin duda fundamental para que estas líneas vieran su fin. Gracias por ser ese hermano que me soportó cuando lo necesité.

*“Conocer el amor de los que amamos es el fuego que alimenta la vida”  
Pablo Neruda*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por permitirme lograr un objetivo más en mi camino. Sé que las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida han estado calculadas desde el comienzo de mi vida para llegar a este momento. Gracias.

Quiero agradecer a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, porque a pesar de no ser mi escuela de egreso, me sentí en casa.

Agradezco también al apoyo otorgado por parte de CONACyT mediante la beca 633005

Gracias a los profesores que me guiaron hasta la culminación de mi trabajo, especialmente a mis asesores, el Dr. Juan José Zárate y la Dra. Diana Zamora.

Gracias al Centro de Investigación de Desarrollo Biotecnológico y Diagnóstico SA de CV por hacer posible la realización de mi trabajo experimental. Gracias al Dr. Fernando Jiménez, más que mi asesor externo, es una guía para mí, tanto profesional como personal.

Gracias también a los técnicos de Centro de Investigación de Desarrollo Biotecnológico y Diagnóstico, por el apoyo y las enseñanzas.

Gracias a mi familia Ereño, que sin conocerme solo me dieron ánimo y frases de aliento. Gracias por ser tan solidarias con la causa.

Una mención especial para mis “compañeditos” de generación, Lili, Citlaly, Ana, Fimbres. Les agradezco el haberme hecho sentir como en casa, gracias por aguantar mis preguntas veterinarias bobas, por esas mañanas de chilaquiles y chismes. Gracias por su amistad. Dijo pata!

## ABREVIATURAS

18S	Subunidad 18
A	Adenina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
C	Citosina
c/u	cada uno
F	Forward
FAM	6-carboxi-fluoresceína
Fig	Figura
G	Guanina
Has.	Hectáreas
IHHNV	Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa
iRNA	RNA de interferencia
imRNA	RNA Inmuno específico
IN	Integrasa
IPC	Control Interno Positivo
Kb	kilobases

kDa	Kilo Daltons
<i>L</i>	<i>Litopenaeus</i>
mg	miligramos
min	minuto
nm	nanómetro
NS1	Proteína No Estructural 1
OIE	Organización Internacional de Epizootia
Pb	pares de bases
PCR	Polimerasa Chain Reaction
proPO	Pro-fenol oxidasa
R	Reverse
RDS	Run-Deformity Syndrome
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico ribosomal
RT	Retrotranscriptasa
RT-PCR	Retro Transcripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa
seg	segundos
Sp	especie
T	Tiamina
TAMRA	Tetrametilrodamina
UNG	Uaracil-N Glicosilada

VIC

4,7,2'-triclora-7'-fenil-6-carboxyfluoresceina

mg

microgramo



## INDICE DE CONTENIDO

Página

Índice de contenido .....	ix
Índice de Tablas.....	xi
Índice de Figuras.....	xii
RESÚMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVO.....	4
HIPÓTESIS.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Generalidades de acuicultura.....	5
2.2 <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	6
2.3 Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa.....	9
2.4 Forma Activa e Inactiva de IHHNV.....	11
2.5 Técnicas Moleculares.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Área de estudio.....	14
3.2 Muestreo.....	14
3.3 Procesamiento de Muestras.....	15

<b>3.3.1 Validación del método.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.2 Lisis externa.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.3 Extracción.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.4 Control Interno Positivo (IPC).....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.5 PCR.....</b>	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>

**Índice de Tablas**

**Página**

**Tabla 1. Parámetros de aceptación de Control Interno.....19**

**Tabla 2. Cebadores utilizados en la PCR Tiempo Real.....20**

<b><i>Fig. 1</i></b> <b><i>Morfología interna de un camarón</i></b> .....	<b>6</b>
<b><i>Fig. 2</i></b> <b><i>Localización geográfica del área de estudio</i></b> .....	<b>14</b>
<b><i>Fig. 3.</i></b> <b><i>Diferentes tallas de camarón</i></b> .....	<b>21</b>
<b><i>Fig. 4.</i></b> <b><i>Postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i></i></b> .....	<b>22</b>
<b><i>Fig 5.</i></b> <b><i>Resultados IHHNV. Primera ronda</i></b> .....	<b>23</b>
<b><i>Fig 6.</i></b> <b><i>Resultados IHHNV. Segunda ronda</i></b> .....	<b>24</b>
<b><i>Fig 7.</i></b> <b><i>Resultados NS1. Segunda ronda</i></b> .....	<b>25</b>
<b><i>Fig 8.</i></b> <b><i>Resultados Totales</i></b> .....	<b>26</b>

## RESUMEN

El virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa o IHHNV por sus siglas en inglés de *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus* ha sido responsable en los últimos 24 años de afectar el crecimiento y la supervivencia de algunas especies de camarones penaeidos cultivados.

En México se aisló por primera vez este virus en 1990 y se ha relacionado con retraso del crecimiento del camarón.

En 2009 se estableció la teoría de que cierta parte del genoma del IHHNV pueda estar “alojado” dentro del genoma del camarón blanco, lo que le confiere cierta resistencia a la manifestación de la enfermedad. Esto puede dar explicación a porqué se encuentran organismos “infectados” con el virus, pero no presentan signos visibles de enfermedad, revelándose que es posible diferenciar un diagnóstico de IHHNV entre las dos formas posibles en que se presenta este virus, forma activa e inactiva.

En el presente trabajo, se analizaron 152 muestras de camarón blanco de cultivo, 148 muestras correspondían a organismos juveniles y 4 pertenecían a muestras de postlarvas provenientes de 2 laboratorios diferentes.

Se identificaron las formas activa e inactiva del virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, por medio de PCR en Tiempo Real.

Del total de muestras analizadas, 33% resultaron positivas para la determinación de IHHNV y el 12 % resultó positivo para la secuencia diferencial de IHHNV activo (NS1).

Estos resultados son el resultado previo de un área inexplorada de investigación en la acuicultura, la cual deja la pauta para nuevas formas de tratamientos moleculares y prevención de enfermedades en organismos acuáticos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La importancia de comprender las enfermedades virales que afectan a la acuicultura de camarón, radica en que ésta industria se ha convertido en una fuente importante de empleos, de abastecimiento de alimento e inyecta grandes cantidades de dinero en la economía nacional, en los mercados en los cuales se desarrolla (Maramorosch *et al.*, 1997).

En México, el camarón por su volumen se encuentra posicionado en el lugar 4 de la producción pesquera en México; sin embargo, por su alto valor comercial, lo encontramos en el lugar 1 (Sagarpa-Conapesca, 2013).

Desde el comienzo de la práctica de acuicultura de camarón, las enfermedades virales han afectado seriamente capacidad de producción e impactado en el ámbito económico (Guzmán-Sáenz *et al.*, 2009; Rai, P Safeena, *et al.*, 2012).

Se han reportado más de 20 virus que afectan los cultivos de camarón (Cifuentes Lemus e Gaxiola López, 2003; Fernando, 2011), la infección causada IHHNV genera un gran impacto en *Litopenaeus stylirostris* o camarón azul, causando mortalidades en cultivos que puede llegar hasta el 90% (Lightner, 2006; Morales Covarrubias, 2010). En cambio, en *Litopenaeus vannamei*, la tasa de mortalidad no excede el 5%, en cambio, genera un síndrome conocido como Enanismo o deformidad del rostro (Lightner, 2006; Oie, 2006; Yang *et al.*, 2007).

El IHHNV es el virus más pequeño de los virus conocidos de camarones penaeidos (Sindermann e Lightner, 1988; Maramorosch *et al.*, 1997), pertenece al género Brevidensovirus, familia Parvoviridae; su nombre específico es PstDNV (para el densovirus de *L. stylirostris*) (Cuellar Anjel, 2003). Está formado por una cadena sencilla de ADN, es icosaédrico, sin cubierta y mide aproximadamente de 20 a 22 nm (Rai, P Safeena, *et al.*, 2012).

El virus IHHNV afecta el órgano linfoide, las gónadas, el tejido conectivo, la musculatura, el ganglio y cordón nervioso, la epidermis y el epitelio intestinal (tejidos mesodérmicos y

endodérmicos). El período de incubación varía según la carga viral inicial, susceptibilidad individual, edad y tamaño de los camarones.(Cuellar Anjel, 2003; Lightner, 2006; Oie, 2006). Se han detectado secuencias del virus IHHNV, insertadas en el genoma de camarón *P. monodon* de África oriental, Australia y el Indo-Pacífico oeste, sin que sean infecciosas para *L. vannamei* o para *P. monodon*, (Cuellar Anjel, 2003; Oie, 2006). Teixeira y colaboradores, diferenciaron dos formas del virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, una forma Activa y una Inactiva.

En nuestro país no se ha investigado la presencia de las dos formas del virus IHHNV por lo que el objetivo de éste trabajo fue determinar la presencia ambas formas en una granja de camarón en Guasave, Sinaloa.

## **Objetivo**

Determinar la presencia de las formas Activa e Inactiva del virus de la Necrosis Hipodérmica Infecciosa en una granja de camarón en Guasave, Sinaloa.

## **Hipótesis**

Existe la presencia de dos formas del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, la forma inactiva, encontrada en camarones sin visibles signos de enfermedad pero que resultan positivos en un examen diagnóstico tradicional y la forma activa, encontrada en camarones con visibles signos de enfermedad.

## **Justificación**

El virus IHHNV ha sido responsable en los últimos 24 años de afectar el crecimiento y la supervivencia de algunas especies de camarones peneidos cultivados (Montgomery-Brook *et al.*, 2007). En nuestro país no hay reportes de trabajos que determinen si en las granjas de cultivo de camarón exista la presencia de estas 2 formas del patógeno.



## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades de acuicultura

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es una de las especies de crustáceos de gran impacto económico que genera un importante número de empleos directos e indirectos a través de la explotación y comercialización de sus poblaciones naturales y/o las procedentes de los sistemas controlados por la acuicultura. (Ramos-Cruz, 2012).

A nivel mundial, es uno de los principales crustáceos que generan gran demanda en el mercado, por tal motivo, la investigación en aspectos de aumento de la producción, mejoramiento genético y aprovechamiento de los recursos, avanzan cada día para proveer la información necesaria para que esta actividad se lleve a cabo de la mejor manera.

Sin embargo, al aumentar la práctica de acuicultura se ha incrementado, también el aumento en los problemas de salud del camarón.(Lightner e Pantoja, 2002). En 1989, sólo había seis virus de camarón identificados en todo el mundo. Para 1996 esta cifra había aumentado a 20 virus de camarón.(Oie, 2006) La enfermedad causada por IHHNV está actualmente reconocida como el principal factor limitante para el cultivo de camarón. (Montgomery-Brook *et al.*, 2007)

Otro de los factores que limitan el éxito de la camaronicultura mundial, consiste actualmente en el control de las infecciones, principalmente las de origen viral.(Montgomery-Brook *et al.*, 2007). Las altas densidades poblacionales usualmente utilizadas en los cultivos, propician la rápida propagación de los agentes infecciosos, resultando generalmente en mortalidades masivas y ocasionando, como consecuencia, perjuicios económicos incalculables (Morales e Cuellar, 2008).

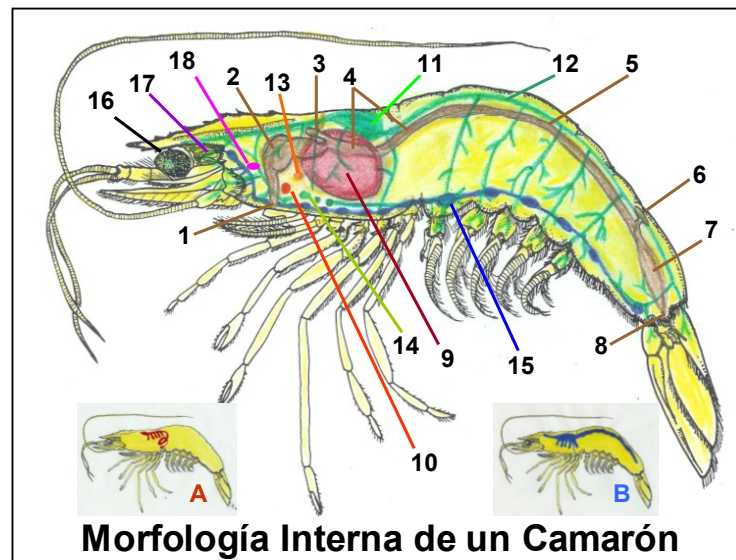
En México, es de especial interés mantener los cultivos de camarón alejados de cualquier amenaza que pueda provocar una disminución en la producción (Fernando, 2011) debido a que es éste ejemplar, el número 1 de las especies pesqueras que se exportan, siendo Estados Unidos de América, Japón y Francia sus principales destinos (Sagarpa, 2011).

## 2.2 *Litopenaeus vannamei*

La mayoría de las especies de camarón utilizadas para acuicultura en todo el mundo, son de la familia *Penaeidae* y la especie más cultivada en América es la especie *vannamei* (Loh *et al.*, 1997)

El camarón blanco o patiblanco como también se le conoce a *Litopenaeus vannamei*, pertenece a un grupo de organismos denominados colectivamente como crustáceos decápodos, o crustáceos que tienen diez pies, aunque en realidad poseen 16, cinco pares que son las que observamos y que emplean primordialmente para caminar sobre el fondo, y los tres primeros pares que están ubicados en la boca y son empleados en el proceso de captura del alimento. (Néstor e Gabriel, 2002).

Están formados por un cefalotórax y un abdomen constituidos por órganos y tejidos (Morales Covarrubias, 2010) los cuales cubren distintas funciones (Fig. 1).



**Fig. 1** *Morfología interna de un camarón*, 1.-Boca, 2.- Estómago, 3.- Ciego Intestinal anterior, 4.- Intestino anterior, 5.- Intestino medio, 6.- Ciego intestinal posterior, 7.- Recto, 8.- Ano, 9.- Hepatopáncreas, 10.-Órgano Mandibular, 11.- Corazón, 12.- Arteria (Aorta) dorsal posterior, 13.- Órgano Linfoide, 14.- Tejido Hematopoyético, 15.- Sistema Nervioso Central, 16.- Ojo, 17.- Glándula Antenal, 18.- Órgano . **A.- Sistema Reprodutor Femenino** **B.- Sistema Reprodutor Masculino**

En el proceso de crecimiento del camarón, para que éste pueda aumentar de tamaño, debe mudar de exoesqueleto y dado que su tracto digestivo también está revestido por una capa quitinosa, cuando se muda de exoesqueleto, también mudan de tracto digestivo, este proceso de muda deja al camarón expuesto y vulnerable a ser atacado por diferentes agentes infecciosos (Fernando, 2011).

La primera línea de defensa de estos animales es proporcionada por la presencia del caparazón externo rígido o exoesqueleto, que funciona como una barrera físico- química protectora. Además de ello, todo el tracto digestivo de estos animales, que es la principal vía de entrada para los microorganismos, también está revestido por una capa quitinosa que ofrece un ambiente ácido y lleno de enzimas, capaz de inactivar y digerir la mayoría de los microorganismos que no son parte de su microbiota natural. (Morales e Cuellar, 2008).

A comparación de otros invertebrados, los crustáceos disponen solamente de un sistema inmune innato, diferente de los vertebrados que además de esto, tienen también un sistema inmune adaptativo.(Fernando, 2011) (Ramos-Cruz, 2012) El sistema inmune innato de los crustáceos, es encontrado en todos los organismos multicelulares, incluyendo invertebrados y plantas, mientras que el sistema inmune adaptativo sólo se encuentra en los vertebrados.(Lee e Söderhäll, 2002).

Este último se caracteriza por la presencia de una infinidad de receptores y anticuerpos altamente específicos y por la inducción de células de memoria, que garantizan una respuesta de defensa altamente eficiente y específica para los más diversos patógenos. (Alberts B. *et al.* 2002). Esta respuesta transcurre de la presencia de una línea celular linfocítica, presente solamente en los vertebrados, donde se apoyan todos los mecanismos de especificidad y de memoria inmunológica.

De esta forma, su ausencia en los invertebrados inviabiliza cualquier tentativa de desarrollo de vacunas, en su concepto clásico de la palabra, disminuyendo así de manera sustancial, la posibilidad de la prevención y control de infecciones en los crustáceos. (Morales e Cuellar, 2008).

La única línea de defensa que tienen los penaeidos es la conferida por la inmunidad innata que

proviene de las células sanguíneas llamadas hemocitos. (Ji *et al.*, 2009)

El sistema circulatorio de los crustáceos es de tipo abierto o semi-abierto, por donde transita un tejido fluido denominado hemolinfa, correspondiente a la sangre de los vertebrados. (Lightner e Pantoja, 2002). En la hemolinfa son transportados continuamente nutrientes, excretas, oxígeno, hormonas y otras moléculas importantes para los diferentes órganos de esos animales. Debido a su fluidez y por la capacidad de llegar directamente a todos los tejidos de los crustáceos, la hemolinfa contiene además todos los componentes del sistema inmunológico. (Fernando, 2011).

La hemolinfa está compuesta por una fracción celular, representada por las células circulantes o hemocitos y por una fracción líquida constituida por el plasma que contiene diferentes factores humorales. (Néstor e Gabriel, 2002) Las respuestas inmuno celulares y humorales actúan de forma integrada en los crustáceos, protegiéndolos contra la invasión de microorganismos y parásitos, garantizando así su integridad corporal y homeostática.

Los principales sistemas de defensa actualmente reconocidos en los crustáceos son:

1. Coagulación de la hemolinfa;
2. Melanización mediada por el sistema Pro-fenol oxidasa (proPO);
3. Reconocimiento y aglutinación celular mediados por las lectinas;
4. Sistemas antibacterianos, antifúngicos y antivirales mediados por los péptidos antimicrobianos, RNA de interferencia y por proteínas de reconocimiento patrón;
5. Producción de formas reactivas de oxígeno y nitrógeno
6. Sistema fagocítico y de encapsulamiento. (Néstor e Gabriel, 2002)

### 2.3 Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa

La enfermedad causada por el virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa genera un particular interés debido a que no causa una infección letal en *Litopenaeus vannamei*, en cambio, produce una reducción en el crecimiento y una variedad de deformidades cuticulares de del rostro, antenas y en zonas torácica y abdominal, deformidades que en conjunto se conoce comúnmente como el síndrome de la deformidad y enanismo ( Run-Deformity Syndrome o RDS) (Lightner e Pantoja, 2001; Sun *et al.*, 2006).

El IHHNV es el virus más pequeño de los virus conocidos de camarones penaeidos (Sindermann e Lightner, 1988; Maramorosch *et al.*, 1997), pertenece al género Brevidensovirus, familia Parvoviridae; su nombre específico es PstDENV (para el densovirus de *L. stylirostris*) (Cuellar Anjel, 2003). El virión del IHHNV es un icosaedro de la familia de los Parvovirus, sin envoltura de 20-22 nm, contiene ADN lineal monocatenario de un tamaño estimado de 3,9 kb, con 3 marcos de lectura y tiene una cápsida con cuatro polipéptidos.(Oie, 2006) (Rai, P Safeena, *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014).

El virus IHHNV afecta el órgano linfoide, las gónadas, el tejido conectivo, la musculatura, el ganglio y cordón nervioso, la epidermis y el epitelio intestinal (tejidos mesodérmicos y endodérmicos). El período de incubación varía según la carga viral inicial, susceptibilidad individual, edad y tamaño de los camarones.(Cuellar Anjel, 2003; Lightner, 2006; Oie, 2006).

Se ha reportado infección natural por IHHNV en camarón (*Penaeus sp.*) En América, afecta a las dos especies más importantes para el comercio de camarón:*Litopenaeus stylirostris* y *Litopenaeus vannamei*. El *L. stylirostris* es altamente susceptible a IHHNV, y el virus causa una enfermedad letal (hasta 90% de mortalidad) mientras que en *L. vannamei* el virus no causa una infección letal (Boada *et al.*, 2008) en esta especie en cambio, produce una enfermedad crónica no letal que se manifiesta con una reducción en el crecimiento y una variedad de deformidades cuticulares del rostrum, la antena y otras zonas torácica y abdominales (Arun K *et al.*, 2001). *Ver Anexo 1 y 2.*

En México este agente infeccioso tiene una presencia importante. Según un estudio realizado en reproductores y que fue publicado el 2014, la prevalencia de esta enfermedad en el noroeste del país oscila entre 30% y 60%. (Mendoza Canoa *et al.*, 2014)

Al igual que en otros países, en México también es una de las principales causas de pérdidas económicas debido a que si bien no genera mortalidades masivas por sí mismo, sí genera problemas en la producción al presentarse como una enfermedad crónica no letal (Chayaburakul *et al.*, 2005). La cual, al afectar el crecimiento, provoca que se cosechen organismos de diferentes tallas (tamaños) (Ruíz Sandoval, 2013) reduciendo drásticamente el peso esperado en toneladas, generando con esto un menor ingreso económico para los productores.

A lo largo del tiempo se han utilizado diferentes técnicas para diagnosticar las enfermedades que atacan el camarón blanco (Lightner e Pantoja, 2001), las cuales incluyen desde microbiología tradicional, histopatología, western blot, ELISA, PCR punto final, PCR Tiempo real, entre otras (Fernando, 2011)

Los beneficios de realizar un diagnóstico oportuno, certero y rápido, son, en poblaciones que ya manifiestan signos de enfermedad, poder identificar el agente causal para determinar el tratamiento a seguir y atacar de manera directa el problema.

En poblaciones que aún no manifiestan signos de enfermedad, el diagnóstico juega un papel importante en el tema de prevención y control, debido a que las enfermedades en el ambiente acuático se propagan más rápido afectando a más organismos en un tiempo muy corto.(Fernando, 2011)

## 2.4 Forma Activa e Inactiva de IHHNV

Se sabe que los crustáceos y los insectos pueden llevar uno o más patógenos virales de forma persistente a niveles bajos, sin presentar ante ello signos de enfermedad y además de eso, pueden transmitirlos a sus descendientes y aunque aún no se conoce el cómo lo hacen, este proceso se ha denominado alojamiento viral (Flegel, 2009).

Según este autor, se puede lograr la protección o tolerancia contra un virus en específico cuando una parte del genoma del virus se aloja en el genoma del hospedador, fragmentos no retrovirales tanto de virus ARN y ADN se han encontrado en los genomas de insectos y crustáceos. Además, secuencias que codifican para la transcriptasa inversa (RT) y la integrasa (IN) también han sido encontrados en crustáceos e insectos (Flegel, 2006; Tassanakajon *et al.*, 2006)

Se planteó la idea de que los camarones y otros artrópodos utilizan estas RT para reconocer mRNA "exterior" de virus de RNA y DNA y que son capaces de utilizar las integrasas (IN) para insertar al azar las secuencias de ADNc cortos en sus genomas.

Estas inserciones dan como resultado la producción de ARN inmunoespecífico (imRNA) capaz de estimular la iRNA que suprime la propagación viral. (Flegel, 2009)

Se ha demostrado que *Penaeus monodon* puede llevar inserto en su genoma, ciertos fragmentos del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa sin que estos presenten signos de la enfermedad (Chayaburakul *et al.*, 2005; Oie, 2016).

Un estudio en Brasil demostró que también se pueden encontrar fragmentos de IHHNV en el genoma de *Litopenaeus vannamei* (Teixeira *et al.*, 2010). Los autores mencionan que el virus al que denominan inactivo es aquel que se encuentra presente en camarones sin visibles signos de enfermedad como talla pequeña, rostrum desviado, o malformaciones cuticulares (Robles-Sikisaka *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014). Mientras que la forma denominada activa, es la encontrada en camarones que si presentan visibles signos de enfermedad.

## 2.5 Técnicas de Diagnóstico Molecular

Para poder detectar el virus, existen diferentes técnicas tradicionales y moleculares que ayudan a la fácil identificación, sin embargo, cuando los métodos clásicos no son lo suficientemente específicos y/o sensitivos, es necesario complementarlos con uno o más métodos moleculares, (Oie, 2006).

La técnica utilizada en este trabajo de investigación, es la de PCR en Tiempo Real debido a que es una técnica más robusta y sensible, basada en la tecnología del ADN. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la hibridación in situ, se han convertido en métodos de rutina para el diagnóstico molecular de IHHNV, principalmente cuando el objetivo es detectar la infección crónica o para obtener camarones reproductores libre de patógenos. (Teixeira *et al.*, 2010).

La PCR multiplica o amplifica exponencialmente una secuencia específica de ADN bicatenario, sintetizando grandes cantidades de un segmento específico de ADN a partir de cantidades inferiores a 1 µg del ADN de muestra a partir de una sola molécula de ADN (Aguilera *et al.*, 2012; Tamay De Dios *et al.*, 2013)

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. (Dhar *et al.*, 2001; Tamay De Dios *et al.*, 2013)

Los ensayos de la PCR en tiempo real son 1,000 veces más sensibles que la hibridación por *Dot blot* y pueden detectar diferencias de una sola copia del ADN. (Aguilera *et al.*, 2012)

Para la amplificación por PCR en tiempo real además de los reactivos que se emplean en la PCR punto final, es necesario emplear un fluoróforo.

En algunos ensayos cuantitativos se requiere determinar el número de moléculas ARNm, por lo que es necesario llevar a cabo una reacción de transcripción reversa del ARN mensajero a ADN complementario antes de que se aplique la PCR en tiempo real.



En este caso, el ensayo se conoce como *retrotranscripción o RT* acoplada a la PCR (RT-PCR), la que puede realizarse en uno o dos pasos. Finalmente, se realiza la amplificación (síntesis) del ADN o ADNc en un termociclador acoplado a un sistema óptico, que monitorea la señal de los fluoróforos usados para detectar el producto amplificado. (Aguilera *et al.*, 2012; Tamay De Dios *et al.*, 2013)

Debido a que la fluorescencia de éstos aumenta conforme el producto se amplifica (Arun K *et al.*, 2001), se combinan los procesos de amplificación y detección en una sola etapa para mejorar los resultados y que la técnica sea más efectiva.

Se han utilizado diferentes técnicas de diagnóstico específicas para detectar el virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, como Dot Blot, Histopatología, exámenes en fresco (Sindermann e Lightner, 1988; Lightner e Pantoja, 2002; Morales Covarrubias, 2010), sin embargo, a lo largo del tiempo y conforme avanza la ciencia, se ha descubierto que la detección mediante PCR es más sensible que por otras técnicas moleculares (Boada *et al.*, 2008)

Adicional a esto, es importante mencionar que el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa ya se encuentra secuenciado en su totalidad (Silva *et al.*, 2014) con número de Acceso en GenBank *AF218266*.

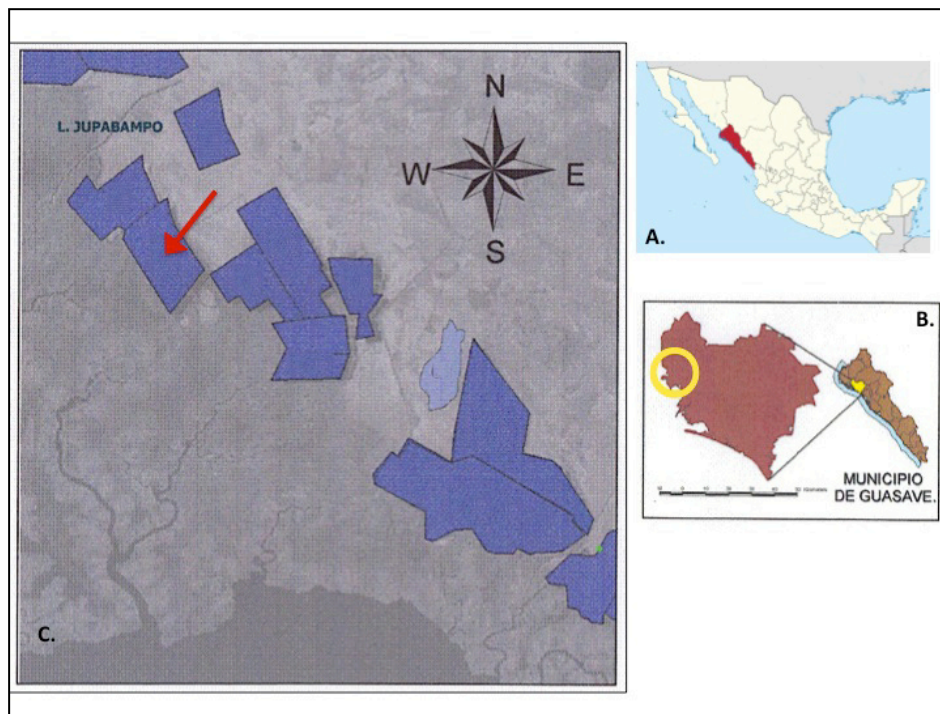
La organización del genoma del IHHNV reveló tres principales dominios de codificación típicos: un ORF1 de 2.001 pb que codifica NS1, una proteína No estructural, un ORF2 (NS2) de 1091 pb que codifica NS2, una proteína no estructural y un ORF3 derecha de 990 pb que codifica una proteína viral. (Teixeira *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014).

Estudios han revelado que la proteína NS1, se encuentra altamente conservada en el virus (GenBank *cl24009*) y que ha sido de utilidad para poder diferenciar las dos formas de éste virus (Teixeira *et al.*, 2010).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el municipio de Guasave, en el Estado de Sinaloa, en la granja Acuícola #3 de la micro zona conocida como “El Cuchillo”. (Fig.2)



**Fig. 2** Localización geográfica del área de estudio. **A.** Mapa de la República Mexicana con el estado de Sinaloa resaltado en rojo. **B.** Municipio de Guasave. **C.** Acercamiento al área de la micro zona “El Cuchillo” en donde se indica con la flecha el lugar de estudio, la Granja #3.

## **3.2 Muestreo**

Debido a que el virus afecta a todas los estadios del camarón (Oie, 2006) (Lightner, 2006) , se realizó un muestreo de 148 organismos juveniles, tomados al azar (Morales Covarrubias, 2010).

El número de muestra se tomó en base a la Tabla de Amos, que indica el tamaño de muestra necesaria para fines de diagnóstico de los patógenos causales de enfermedades virales en crustáceos acuáticos de acuerdo al número de población y tomando una prevalencia del 2% (NOM-030-PESCA) (Lightner e Pantoja, 2001) (Morales Covarrubias, 2010).

De acuerdo a la información proporcionada por el productor de la granja en donde se llevó a cabo el estudio, ésta se sembró con una densidad de 15 organismos por m<sup>2</sup>, siendo la superficie total de la granja de 70 Has. por lo tanto, según la Tabla modificada por Amos, la cantidad adecuada de organismos muestreados deberán ser 150.

Para este estudio se tomaron 148 muestras de camarones juveniles completamente al azar, además, se tomaron 4 muestras de postlarvas que se utilizaron para sembrar el estanque, procedentes de 2 laboratorios diferentes de postlarvas.

Los organismos colectados se tomaron completamente al azar (Lightner e Pantoja, 2001; Morales Covarrubias, 2010) en 5 puntos diferentes del estanque mediante redes y se colocaron en frascos nuevos, limpios, con alcohol absoluto para su posterior análisis molecular . *Ver Anexo 3.*

## **3.3 Procesamiento de Muestras**

### **3.3.1 Validación del Método**

La validación se realizó de acuerdo a la norma mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 emitida por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A.C., en el Centro de Investigación de Desarrollo Biotecnológico y Diagnóstico S.A. de C.V. (Trámite 16LP0930 Acreditación Inicial ante EMA)

Se utilizaron primers y sondas del kit TaqMan® Ribosomal RNA Control (VIC) Reagents de Life Technologies.

Control Interno Positivo (IPC) en los ensayos de PCR tiempo real, y es amplificada en todas las muestras.

### **3.3.2 Lisis externa**

Antes de realizar la extracción de ácidos nucleicos, las muestras de pleópodos pasaron por un proceso de lisis externa, debido a que la cubierta quitinosa que se encuentra presenta puede actuar como inhibidor de la PCR. (Silva *et al.*, 2014)

Para la destrucción del tejido se lleva a cabo una lisis externa mediante el MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit – Lysis / Binding Buffer, el cual contiene isotiocianato de guanidina que realiza una lisis celular así como una efectiva inactivación de enzimas como las nucleasas (ROCHE).

Para esta etapa se utilizaron tubos homogeneizadores con perlas de cristal, los cuales se identificaron debidamente. Según la OIE en su Manual acuático, menciona que “las muestras que se toman para pruebas moleculares pueden combinarse convirtiéndolas en muestras compuestas que representen no más de cinco ejemplares de juveniles, subadultos o adultos cada una”, en este caso se trabajó con pooles de 3 y 5 ejemplares cada uno, por lo cual en el protocolo interno se determinó pesar 25mg de cada muestra.

Las muestras de post larvas se tomaron como muestras individuales, es decir no se hicieron pools.

En la primera ronda de análisis se hicieron 16 pools de 5 organismos cada uno, analizando un total de 72 muestras. Se tomó como criterio para agruparlos, el tamaño de los organismos haciendo los pools de más grandes a más pequeños, las muestras de postlarvas se analizaron individual.

En la segunda ronda de análisis se tomó el mismo criterio, pero en esta ocasión los pools se formaron con 3 organismos cada uno agrupándolos también por tamaño.

Las muestras de postlarvas se tomaron como una muestra individual cada una.

El procedimiento consiste en:

1. Agregar 500µL del Lysis/Binding Buffer a cada uno de los tubos con perlas de cristal que contienen la muestra y homogeneizarlas.
2. Homogeneizar con el equipo MagNa Lyser a 90 seg a 5000rpm
3. Las muestras de tejido después del MagNA Lyser se colocan en la microcentrífuga para eliminar la espuma generada por la agitación, durante 3min a 5000rpm.
4. Una vez homogeneizadas las muestras se colocan en una gradilla y se dejan incubando por 30min a temperatura ambiente.
5. Transcurrido este tiempo se procede con la extracción.

### 3.3.3 Extracción

Después de realizar la lisis externa, se pasó al proceso de extracción de Ácidos Nucleicos

1. Para extraer los ácidos nucleicos totales se emplearon los equipos MagNA Pure LC 2.0 utilizando los kits MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit de Roche (03 038 505 001) que contenían:
  1. Wash Buffer I (Tapa Negra) contenían cloruro de guanidina y etanol para eliminar inhibidores de la PCR.
  2. Wash Buffer II (Tapa Azul) contenían etanol para remoción de sales, proteínas, etc.
  3. Wash Buffer III (Tapa Roja) remoción de sales, etc.
  4. Lysis/Binding Buffer (Tapa Verde) contenían tiocianato de guanidina y triton X-100 para lisis celular y unión de ácidos nucleicos totales.
  5. Proteinase K (Tapa Rosa) contenían una serina proteasa del hongo *Engyodontium album* (antes *Tritirachium album*) para digestión de proteínas. Este reactivo viene liofilizado y se reconstituyó agregando 3 mL de Elution Buffer, se homogeneizó completamente, y agregaron otros 2 mL del mismo buffer. Una vez reconstituido es estable por 1mes si se mantiene entre 2 y 8°C o por 12 meses mantenido a -20°C.
  6. Magnetic Glass Particles (MGPs) Suspension (Tapa Caramelo) contenían partículas de sílice magnéticas en propanol para la unión de ácidos nucleicos totales. Este reactivo se homogeneizó antes de su uso para evitar la sedimentación de las partículas.

Elution Buffer (Tapa Amarilla) para reconstituir la proteinasa K y para elución de los ácidos nucleicos totales

El equipo se preparó con los datos de las muestras, posteriormente se seleccionó el protocolo de purificación "TOTAL NA EXTERNAL LYSIS".

Se colocaron de 400 a 500µl de las muestras provenientes de la lisis externa. Al final de la extracción se eluyeron a 100µl.

Al finalizar los equipos, las extracciones se conservaron a -20°C hasta su proceso en PCR Tiempo Real.

### **3.3.4 Control Interno Positivo (IPC)**

Se utilizó una secuencia de 180 pb del gen 18S ARN ribosomal (rRNA), una región conservada del genoma de un diverso grupo de organismos eucariotas, por ejemplo: el camarón blanco. Esta región es homóloga al juego de cebadores y sondas del kit TaqMan® Ribosomal RNA Control (VIC) Reagents de Life Technologies.

Esta secuencia es utilizada como un Control Interno Positivo (IPC) en los ensayos de PCR tiempo real, y es amplificada en todas las muestras y en los calibradores. El propósito de este control es determinar que una muestra fue procesada correctamente.

El Kit Taqman Ribosomal RNA Reagents comercial amplifica para un diverso grupo de organismos Eucariotas. El control de la calidad en la reacción se basa en la detección del gen 18S ribosomal.

Debido a la abundancia de RNA Ribosomal, es probable que se obtengan valores de "CT" bajos, para corregir este problema se debe ajustar la línea basal la cual debe visualizarse de tal manera que el crecimiento de la curva de amplificación comience en un número de ciclo donde se observe el crecimiento logarítmico de dicha curva.

-Kit Taqman Exogenous Internal Positive Control

Este kit comercial está preoptimizado para distinguir entre un resultado negativo y un producto de la inhibición de la PCR. Evita además la amplificación de genes endógenos y permite la coamplificación del IPC y la secuencia diana sin comprometer la amplificación de la secuencia diana.

Los parámetros para aceptar control de calidad interno en las reacciones de PCR se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Parámetros de aceptación de Control Interno**

Secuencia buscada (FAM)	IPC	Interpretación
+	+,-	+
-	+	-
-	-	<b>rechazado</b>

### 3.3.5 PCR

Los cebadores y las sondas que se utilizaron para detectar IHHNV son los recomendados por la OIE para la técnica de PCR en Tiempo Real (Oie, 2006): Los cebadores y la sonda TaqMan están diseñados por el sistema Primer Express (Applied Biosystems. La sonda TaqMan se marcó con los colorantes fluorescentes 5-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5', y N,N,N',N'-tetrametil- 6- carboxirodamina (TAMRA) en el extremo 3' (Applied Biosystems, parte n°450025).

Para distinguir entre IHHNV activo e inactivo se diseñaron cebadores y sondas para la región que codifica la NS1 del virus. Acceso GeneBank AF59415.1 (Teixeira *et al.*, 2010).

Las secuencias de los cebadores y las sondas utilizadas se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Cebadores utilizados en la PCR Tiempo Real**

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>%GC</b>	<b>GeneBank Acceso</b>
VNHHI1608F	TACTCCGCACACCCAACCA	57.9%	
VNHHI1688R	GGCTCTGGCAGCAAAGGTAA	55%	AF218266
SONDA	ACCAGACATAGAGCTACAATCCTCGCCTATTG	45.5%	
IHHNVNS1F	GTAGTGCACCGATGGTAAGAG	52.4%	
IHHNVNS1R	TCCGTGTACCAGAAATCTTAGC	54.4%	AF59415.1
SONDA	CTCCAAGGACCAACAGGAACAGGAAA	50%	

Para las corridas de PCR en tiempo Real se trabajó con el kit TaqMan Fast Advanced master Mix 2 x 4444554 de ROCHE que contiene según el fabricante:

1. Polimerasa AmpliTaq® Fast DNA
2. Uracil-N glicosilasa (UNG)
3. dNTPs con dUTP
4. Colorante ROX™ (referencia pasiva)
5. Buffer

Se utilizó un volumen de 15µl de master mix Fast Advance, 1µl de Reverse IPC, 1µl de Forward IPC, 1µl de cebadores (For/Rev) y 2µl de ácidos nucleicos extradiados de la muestra.



El diseño del experimento fue de 60°C por 30 seg para el Pre-PCR, 50°C por 2 min, luego se subió la temperatura a 95°C por 20 seg para el Holding stage, para el cycling stage 95°C por 1 seg y 60°C por 20 seg, para el post PCR 60°C por 30 seg. durante 40 ciclos.

#### 4. RESULTADOS

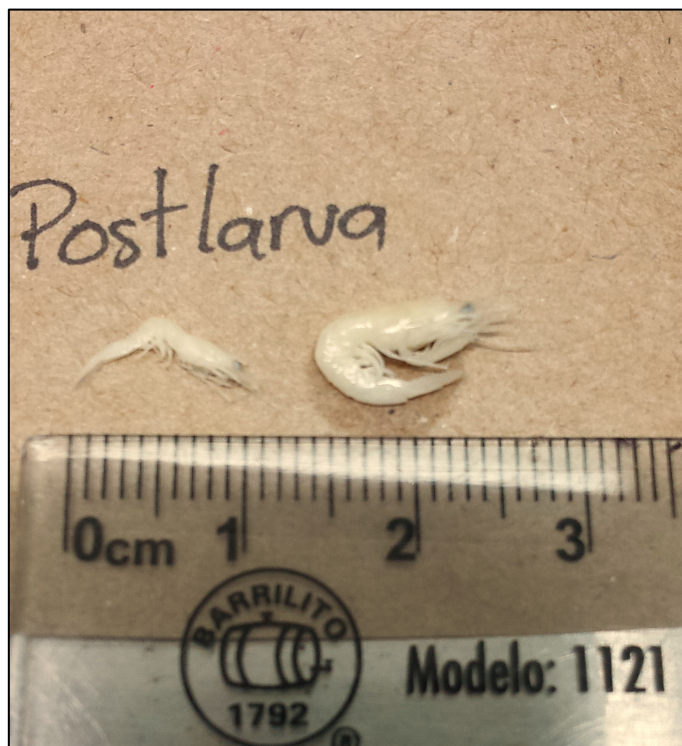
En la primera ronda de detección del agente infeccioso (IHHNV) con los cebadores recomendados por la OIE, se analizaron 16 pools, 14 pools contenían 5 organismos cada uno, 2 pools eran de postlarvas, cada uno de un laboratorio diferente. Se tomó como criterio para agruparlos, el tamaño de los organismos haciendo los pools del más grande al más pequeño.

Fig 3.



**Fig. 3.** Diferentes tallas de camarón. Se observa marcada diferencia en los organismos colectados de un mismo estanque en donde se encuentran bajo las mismas condiciones de alimentación, físicas y de manejo.

Se formaron 7 pools con los organismos de mayor tamaño y 7 con los de tallas más pequeñas. Las 2 muestras de postlarvas se procesaron de manera individual, aunque en la misma muestra se podían observar organismos con morfología diferente como se aprecia en la Fig 4.

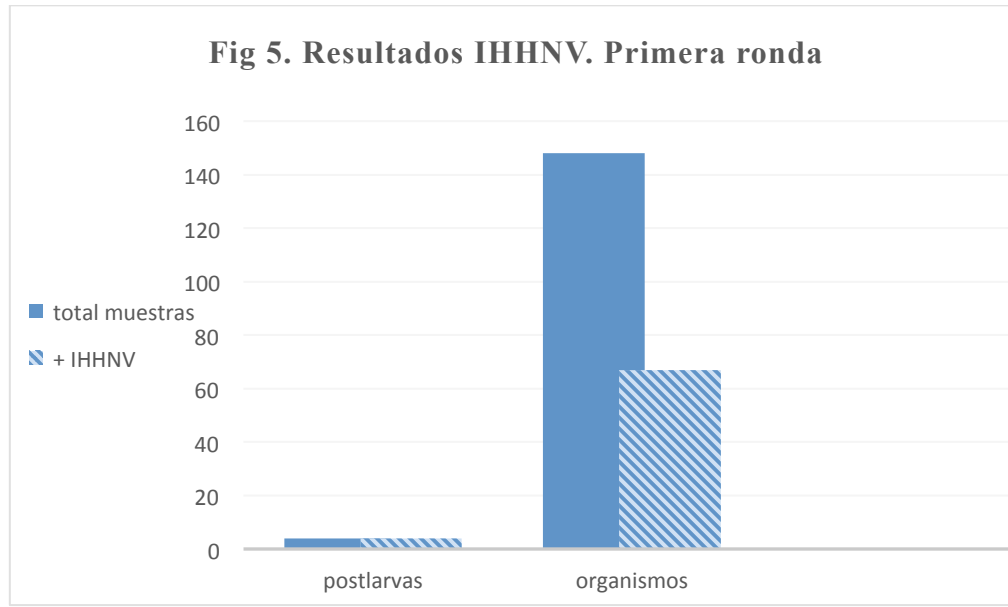


***Fig. 4.*** Postlarvas de *Litopenaeus vannamei*.

En la Fig. 5 se muestran los resultados obtenidos de los primeros 16 pools analizados, 7 corresponden a organismos de talla Grande, 7 a talla Pequeña y 2 a Postlarvas. *Ver Anexo 5.*

El total de pools positivos fueron 10. 8 corresponden a pool de 5 organismos y 2 a las muestras de postlarvas.

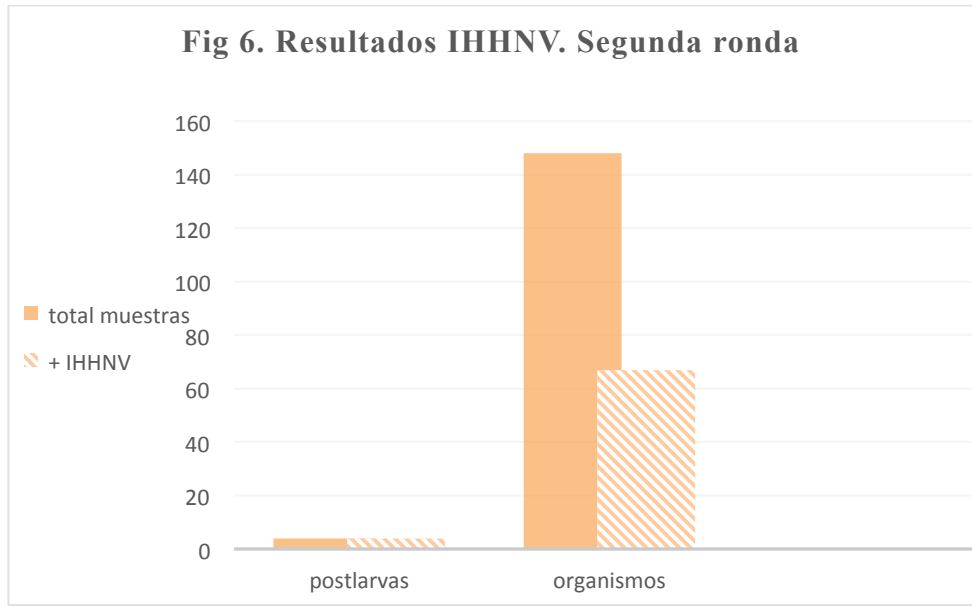
Del 100% de muestras analizadas en esta primera fase de análisis, el 17% de las muestras detectadas como positivas corresponden a organismos de talla grande, 28% a organismos de talla pequeña y 20% a postlarvas.



Posteriormente estas muestras que arrojaron resultado positivo, se sometieron al análisis para discriminar la forma activa e inactiva del IHHNV, con los primers IHHNVNS1, arrojando 0 resultados positivos.

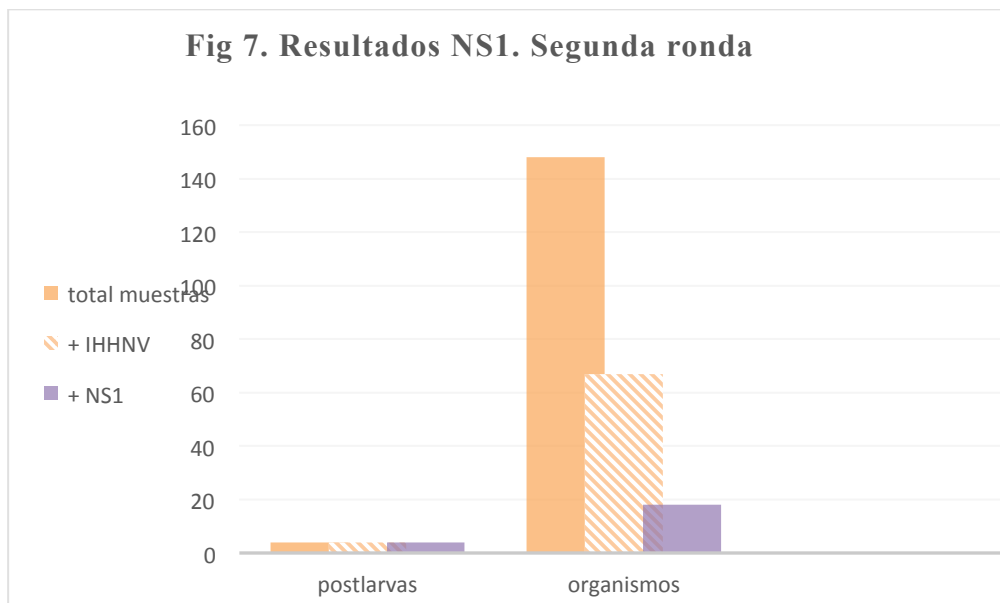
En la segunda ronda de análisis para la detección del agente infeccioso, se analizaron un total de 80 muestras, se hicieron 26 pools de 3 organismos c/u, y 2 muestras individuales correspondientes a las postlarvas.

Los resultados e muestran en la Fig. 6. Del 100% de las muestras analizadas en esta segunda fase de análisis, el 28.5% de los resultados positivos corresponde a organismos de talla pequeña, el 3.5% a organismos de talla grande y el 7% a postlarvas.



De las muestras resultantes como positivas para el diagnóstico de IHHNV, se pasaron a un segundo análisis para discriminar entre las formas activa e inactiva del virus. Esta vez si encontramos resultados positivos.

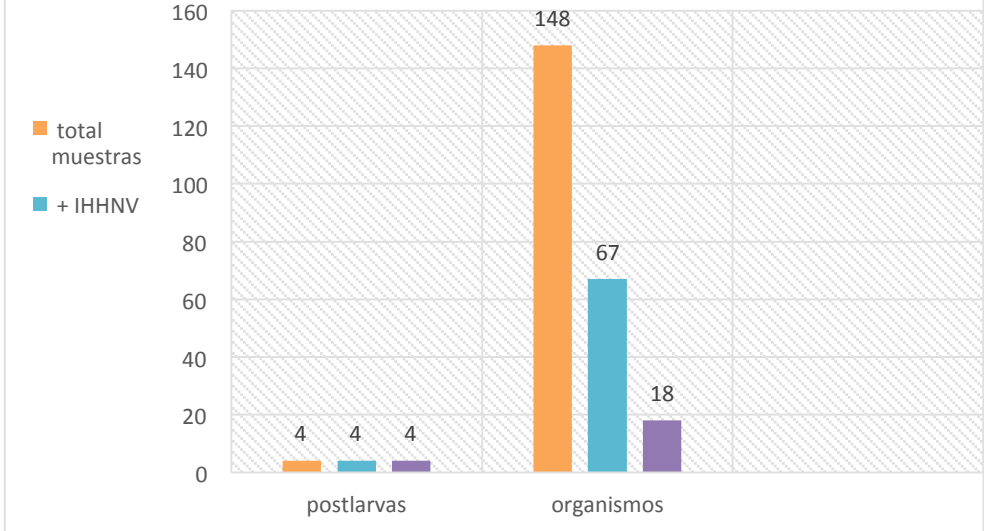
Los resultados se muestran en la Fig 7, en donde observamos que se detectó NS1 en el 7% de postlarvas, en 21.4 de organismos de talla pequeña y no se detectó en organismos de talla grande.



En total de 148 organismos colectados, 67 dieron positivo en un examen de diagnóstico por PCR en tiempo Real utilizando los primers sugeridos por la OIE para detectar IHHNV, de las 4 muestras de postlarvas, las 4 dieron resultado positivo para detectar IHHNV.

En el examen realizado para diferenciar las formas activa e inactiva por PCR Tiempo Real, se buscó una zona conservada de la NS1, proteína no estructural indispensable para la replicación del virus (Rai, Safeena , *et al.*, 2012) y solo se encontraron 18 organismos positivos y las 4 muestras de postlarvas. Fig. 8

**Fig 8. Resultados Totales**



## 5. DISCUSIÓN

Los organismos que se colectaron para el presente estudio se encontraban con las mismas condiciones de manejo, alimento y en las instalaciones sin cambio alguno al momento de la colecta.

Como observamos en la figura 2, a pesar de que los organismos tenían las mismas condiciones y la misma oportunidad de alimento, nos encontramos con ejemplares de tamaños muy diversos.

Al momento de la colecta, algunos camarones presentaban visibles signos de retardo del crecimiento, uno de los signos característicos de la infección por el virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (Lightner e Pantoja, 2002; Guzmán-Sáenz *et al.*, 2009; Oie, 2016).

Tomando en cuenta que del total de las muestras de organismos juveniles (148) 64% estaba representado por camarones aparentemente enfermos o de talla pequeña y el 36% por camarones aparentemente sanos o de talla grande, muchos de estos camarones de talla pequeña, dieron un resultado positivo en la detección de IHHNV mediante PCR en Tiempo real.

El 33% de las muestras de organismos de talla pequeña arrojaron un resultado positivo para el diagnóstico de IHHNV por PCR en tiempo real, esto es casi la mitad de los camarones pequeños.

Mientras que los camarones de talla grande o aparentemente sanos representaron el 36% del total de las muestras colectadas, el 12% dio positivo para el diagnóstico de IHHNV por PCR en tiempo real, es decir, una tercera parte de los organismos aparentemente sanos resultaron positivos.

El uso de transcripción inversa como diagnóstico diferencial de *IHHNV* demostró ser útil para discriminar entre activo (infecciosa) y no activo (no infecciosa) o genoma integrado al *IHHNV*. (Teixeira, 2014)

Las infecciones inocuas podrían explicarse por el concepto de alojamiento viral. Algunos autores proponen que el alojamiento viral es un éxito evolutivo, una alternativa para el desarrollo de resistencia a ciertos virus y que surgió de la interacción de un crustáceo con sus patógenos virales. (Flegel, 2006).

Según el autor, el alojamiento viral está caracterizado por la presencia de un mecanismo activo de tolerar un patógeno y por la ausencia de una defensa activa en contra de ella”. Aunque el mecanismo exacto del proceso que se lleva a cabo para que el alojamiento viral tenga lugar aún no se conoce con exactitud, si se sabe que es éste mecanismo el que le confiere resistencia al camarón blanco de cultivo ante, por lo menos, el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (Flegel, 2006; Flegel, 2009; Teixeira-López *et al.*, 2011).

Los parvovirus codifican dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2. El ARNm para NS2 contiene la secuencia de codificación para los primeros 87 aminoácidos de NS1 debido a que empalma un marco de lectura. NS1, es la proteína no estructural más importante de este virus. Es esencial para la replicación del ADN. Es una fosfoproteína nuclear de 83 kDa. Tiene ADN helicasa y actividad de la ATPasa. (Acceso GenBank cl24009).

Aunque el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa forma parte de la familia *Parvoviridae*, lo cual significa que su material genético es de DNA, (Arun K *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2014), es posible aceptar la idea de que se puede integrar al genoma de *Litopenaeus vannamei* puesto que esta el antecedente de que ya se han identificado en *Penaeus monodon* ciertos fragmentos de este mismo virus, el cual no resulta virulento para esa especie (Oie, 2006; Flegel, 2009).

Como *P monodon* ya se está totalmente secuenciado, se encontraron secuencias en su genoma que codifican para Integrasas (IN) y Retrotranscriptasas (RT) (Tassanakajon *et al.*, 2006) las cuales podrían también estar presentes en *L. vannamei*,



Los resultados del análisis para la detección la región NS1 del virus IHHNV, que codifica para la proteína no estructural, es el decisor para determinar la forma activa del virus (Flegel, 2009; Teixeira *et al.*, 2010)

Solo el 18% del total de las muestras de organismos juveniles positivos para IHHNV, arrojaron un resultado positivo para éste análisis de NS1, es decir, una quinta parte de las muestras positivas para el diagnóstico tradicional de IHHNV tienen la forma activa del virus. Todas las muestras positivas para NS1, son organismos de talla pequeña.

Esos resultados refuerzan el concepto de alojamiento viral, el cual se apoya no sólo por la falta de reacciones de defensa contra patógenos virales visibles, sino también por la reciente información de los sistemas de cultivo de camarón que indica que las diferentes infecciones virales en diversas especies de camarón han convertido rápidamente en inocuas después de un período inicial de la mortalidad catastrófica (Tang e Lightner, 2001; Lightner, 2006; Flegel, 2009; Silva *et al.*, 2014).

Otro efecto es la disminución significativa en el número de larvas eclosionadas, esto debido a la capacidad que tiene el virus de ser transmitido de forma vertical, de madres a hijos(Sánchez P. *et al.*, 2010).

La 4 muestras de postlarvas que se colectaron, dieron positivo al diagnóstico de IHHNV mediante PCR en tiempo Real y al NS1 a pesar de provenir de 2 laboratorios diferentes. En el 2014 se realizó un estudio en 5 laboratorios que producen postlarvas para determinar la prevalencia de IHHNV en los organismos reproductores, arrojando como resultado una prevalencia de la enfermedad entre 30 y 60% (Mendoza Canoa *et al.*, 2014).

Como la enfermedad y la tolerancia se transmiten de manera vertical (Flegel, 2009; Sánchez P. *et al.*, 2010) puede ser que no todos los reproductores de los cuales provienen las larvas que se utilizaron para sembrar el estanque objeto de estudio estuvieran infectados con IHHNV, pero debido a su alta prevalencia (Mendoza Canoa *et al.*, 2014) las 4 muestras colectadas dieron positivo a IHHNV y a NS1.

Otros factores también pueden influir en la disparidad de tallas presentes en los camarones colectados, aunque se sabe que el cultivo se encuentra bajo las mismas condiciones de manejo, que se alimenta de la misma manera y que los factores climáticos afectan igual al estanque, existe la posibilidad que la diferencia de tamaño se deba a que en el medio ambiente acuático, los camarones compiten por el alimento disponible (Ramos-Cruz, 2012).

Esto puede ocasionar que no todos los camarones tengan acceso a la misma porción de alimento y unos coman más que otros, por lo tanto aumentan de peso más rápido que otros.

Esta podría ser la respuesta a los camarones de talla pequeña o aparentemente enfermos que no resultaron positivos al análisis para determinar la presencia de IHHNV.

Mientras que los camarones de talla grande o aparentemente sanos que resultaron positivos al virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, por su apariencia y por no resultar positivos al diagnóstico de NS1, es decir, son portadores de la forma inactiva de IHHNV, por lo tanto no presentan signos aparentes de la enfermedad que éste causa, tal vez los padres de estos organismos les transmitieron la tolerancia al virus y éstos al encontrarse en la condiciones adecuadas, se pudieron desarrollar sin ningún problema aparente.

## 6. CONCLUSIÓN

Se encontraron las dos formas del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa en una granja de camarón blanco en Guasave, Sinaloa.

Algunos de los camarones aparentemente sanos, resultaron portadores de la forma inactiva del virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa.

Algunos de los camarones con aparentes signos de la enfermedad, resultaron portadores de la forma activa del virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa.

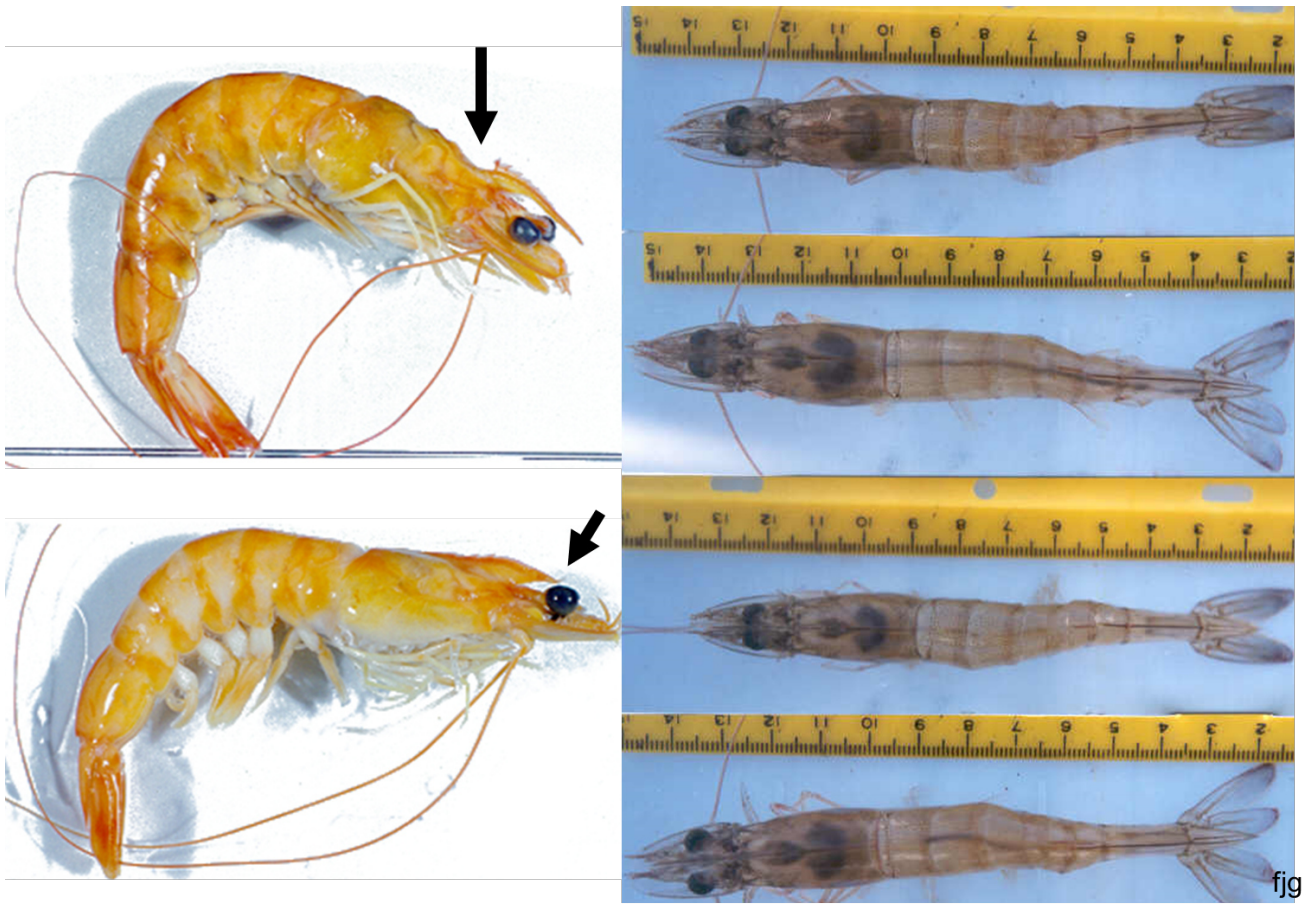
El crecimiento comercial de la acuicultura está generando problemas relacionados con la sanidad de los organismos acuáticos, específicamente de camarón blanco. Nos corresponde a los investigadores desarrollar nuevas y mejores estrategias para contrarrestar los problemas que surgen al paso del tiempo.

Con la aparición de herramientas moleculares que permiten el diagnóstico oportuno de enfermedades facilita el actuar correcto de quienes están a cargo de las granjas.

Con esos resultados se abren las puertas a nuevas investigaciones para descifrar si esta integración de IHHNV en el genoma de *Litopenaeus vannamei* se realiza mediante un mecanismo estable o al azar. De lo anterior quizá depende la resistencia a la enfermedad y que se diseñe algún tipo de terapia génica para evitar esta enfermedad en el camarón de acuicultura.

## ANEXOS

**Anexo 1. Características de Organismos Infeccionados por IHHNV. Deformación en el rostro (flechas) y desviación de los segmentos abdominales (Fotografías de la derecha)**



*Fotografías cortesía del Dr Fernando Jiménez Guzmán*

**Anexo 2. Malformaciones ocasionadas por IHHNV en rostro y cutícula**



*Fotografías cortesía del Dr Fernando Jiménez Guzmán*

### Anexo 3. Colecta de organismos mediante redes



#### **Anexo 4. Lista de Equipo utilizado en el proyecto**

Equipos\*\* equivalentes pueden ser utilizados en el proceso en Instalaciones del CIDByD:

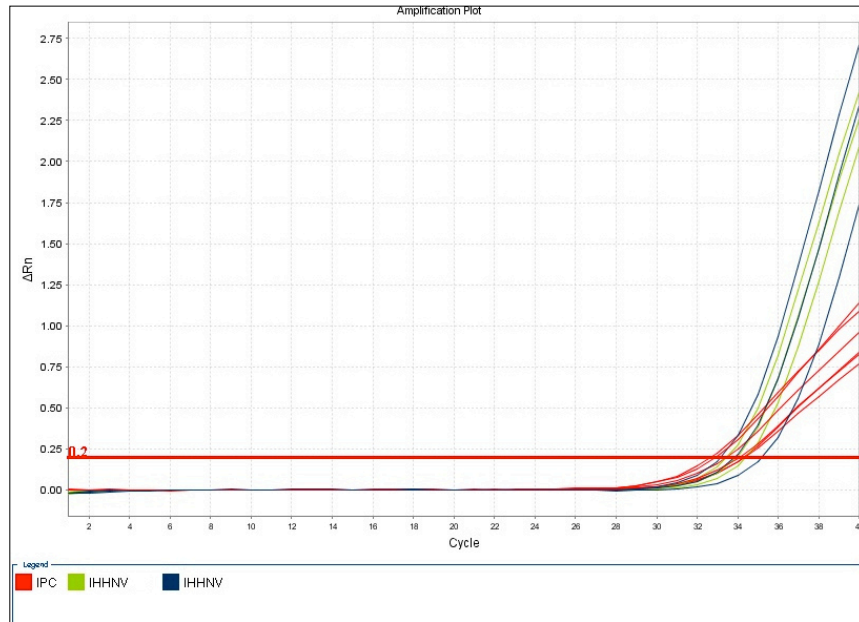
1. Micropipetas con volumen ajustable
  1. Eppendorf Reference 100-1000 $\mu$ L (EM-002)
  2. Eppendorf 2-10  $\mu$ L (EM-008)
  3. Accu plus 20-200 $\mu$ L (EM-018)
  4. Accu plus 0.5-10 $\mu$ L (EM-019)
  5. Labmate 2-20  $\mu$ L (EM-007)
  6. Labmate 20-200  $\mu$ L (EM-001)
2. Micropipetas con volumen fijo
  1. Labsystems 500 $\mu$ L (EM-003)
  2. Labsystems 500 $\mu$ L (EM-005)
3. Termoblock Thermolyne Type 17600 Dry Bath (EP-003)
4. Balanza analítica con precisión a 10 mg AND HR-200 (EM-010)
5. Microcentrífugas
  1. Eppendorf MiniSpin Plus con capacidad de 14500 rpm (EP-008)
  2. Eppendorf Centrifuga 5415C con capacidad de 14000 rpm (EP-009)
6. Vortex
  1. Thermolyne Maxi mix II Type 37600 (EP-001)
  2. Baxter Scientific Products Super Mixer II Cat.No.58220-1 (EP-002)
7. Cronómetro
8. Termómetro IMM (EM-015)
9. Disruptor y Homogeneizador de tejidos MagNA Lyser Roche (EP-013)
10. Equipos de extracción automatizada de ácidos nucleicos
  1. MagNa Pure LC 2.0 Roche (EP-021)
  2. MagNA Pure Compact Roche (EP-016)
  3. MagNA Pure Compact Roche (EP-012)
11. PCR Workstation CBS Scientific (EP-004)

12. Termocicladores Applied Biosystems
  1. StepOne Real-Time PCR System(EP-007)
  2. StepOne Real-Time PCR System (EP-017)
13. Espectrofotómetro UV NanoVue General Electric con capacidad de medidad de 260 y 280 nm usando volúmenes pequeños (ejemplo: 2µL)
14. Refrigerador mabe (EP-023)
15. Congelador Frigidaire Gallery que se encuentra -20°C (EP-022)
16. UV Stratalinker 1800 Stratagene (EP-015)

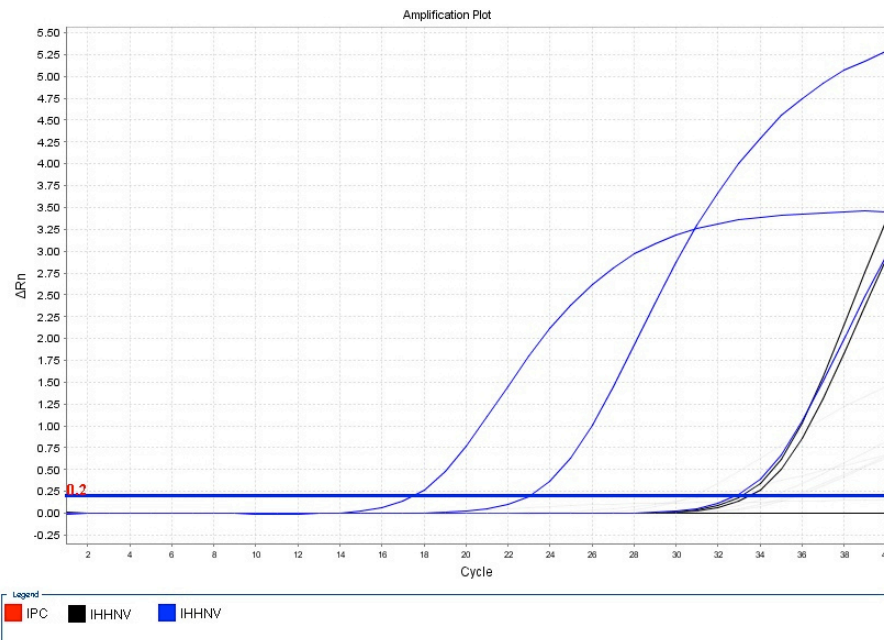
***\*\*Los códigos de los equipos son códigos internos del Centro de Investigación de Desarrollo Biotecnológico y Diagnóstico SA de CV***



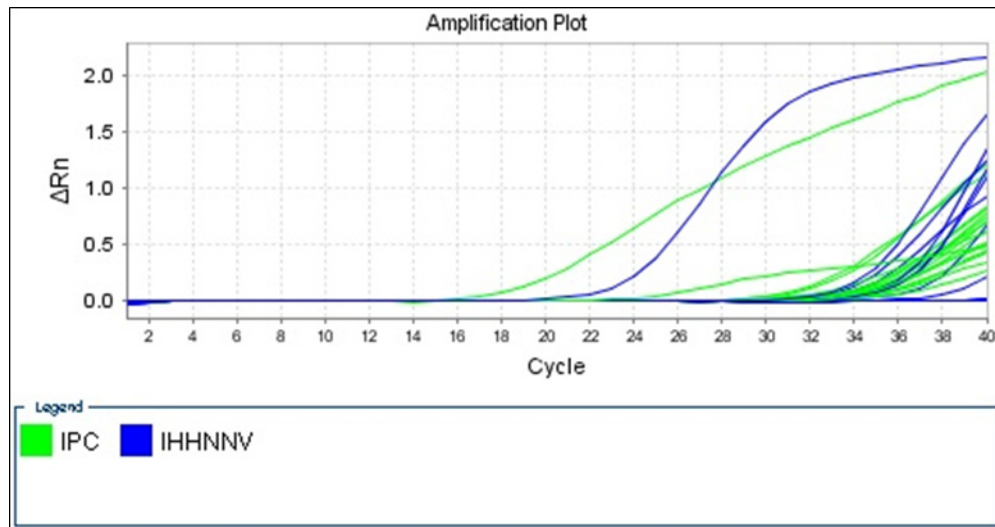
## Anexo 5. Curvas de Resultados



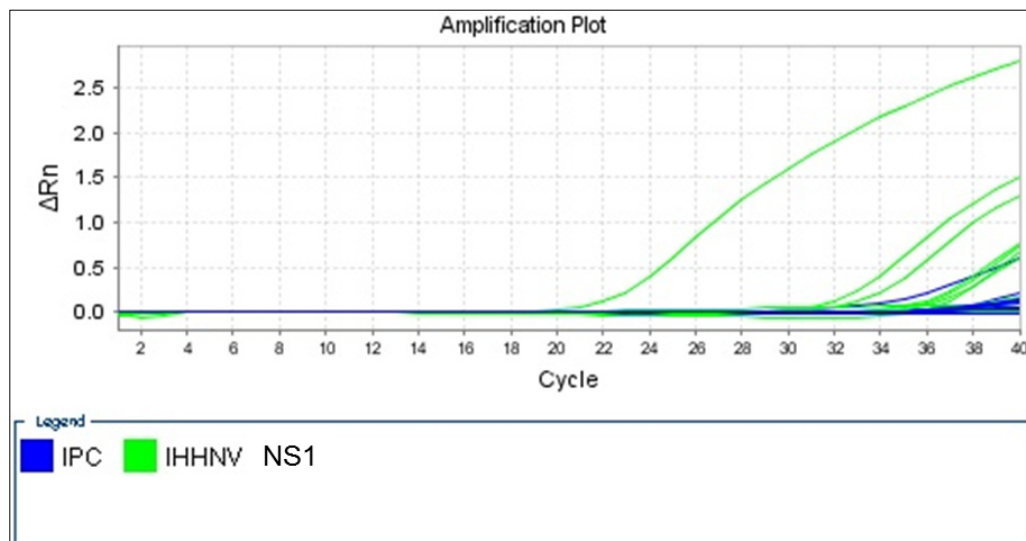
Curva de Resultados Primera ronda de experimento, pools positivos de talla grande, se muestra el IPC (curvas en rojo)



Curva de Resultados Primera ronda de experimento, pools positivos de talla pequeña, no se muestra el IPC



Curva de Resultados para IHHNV, Segunda ronda de experimento, se muestra el IPC color verde



Curva de Resultados para NS1, Segunda ronda de experimento, se muestra el IPC color azul

## Bibliografía

AGUILERA, P.; RUIZ, M.; CHÁNEZ, M. E. **PCR en Tiempo Real: Herramientas Moleculares Aplicadas a la Ecología**: 28 p. 2012.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; **Molecular Biology of the Cell**, New York; Garland Science, 4 Ed

ARUN K, D.; MICHELLE M, R.; KURT R, K. **Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and White Spot Virus in Shrimp Using Real-Time Quantitative PCR and SYBR Green Chemistry**. United States: JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 39: 2835-2845 p. 2001.

BOADA, M.; DE DONATO, M.; RUDOLFO, H. **Detection of the Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in Asymptomatic Cultured White Shrimp, Litopenaeus vannamei (Boone), in Venezuela**. Venezuela: Revista Científica, FCV-LUZ XVIII: 7-11 p. 2008.

BONAMI, J.-R. et al. **Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps**. Great Britain: Journal of General Virology. 71: 2657-2664 p. 1990.

CHAYABURAKUL, K. et al. **different responses to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in Penaeus monodon and P. vannamei**. USA: Dis Aquat Org. 67: 192-200 p. 2005.

CIFUENTES LEMUS, J. L.; GAXIOLA LÓPEZ, J. **Atlas de los Ecosistemas de Sinaloa**. Sinaloa, México: el Colegio de Sinaloa. 1: 226-245 p. 2003.

CUELLAR ANJEL, J. **Necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHN) Síndrome de deformidad y enanismo ("runt deformity syndrome") (RDS)**. US: Institute for International for cooperation in Animals Biologics: 4 p. 2003.

DHAR, A. K.; ROUX, M. M.; KLIMPEL, K. R. **Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and White Spot Virus in Shrimp Using Real-Time Quantitative PCR and SYBR Green Chemistry**. California, US: JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 39: 2835-2845 p. 2001.

FERNANDO, J. G. **Principales enfermedades virales del camarón**. México: 56 p. 2011.

FLEGEL, T. W. **Update on viral accommodation, a model for host viral interaction in shrimp and other arthropods**. Thailand: Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology, Elsevier: 218-228 p. 2006.

Flegel, T W. **Hypothesis for heritable, anti-viral immunity in crustaceans and insects**. Tailand: Biology Direct. 32: 8 p. 2009.

GUZMÁN-SÁENZ, F. M. et al. Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) y virus del síndrome de Taura (TSV) en camarón silvestre (*Farfantepenaeus aztecus* Ives, 1891 y *Litopenaeus setiferus* Linnaeus, 1767) de La Laguna Madre, Golfo de México. **Revista de biología marina y oceanografía**, v. 44, p. 663-672, 2009. ISSN 0718-1957. Disponible em: < [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-19572009000300012&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572009000300012&nrm=iso) >.

Ji, P.-F.; YAO, C.-L.; WANG, Z.-Y. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 4, p. 563-570, 10// 2009. ISSN 1050-4648. Disponible em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464809002678> >.

LEE, S. Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish Shellfish Immunol**, v. 12, n. 5, p. 421-37, May 2002. ISSN 1050-4648. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194453> >.

LIGHTNER, D.; PANTOJA, C. **Manual para el Diagnóstico de Enfermedades del Camarón**. USA: USDA: 92 p. 2001.

LIGHTNER, D. V. **The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV:History in the Americas and current status**: 20 pp p. 2006.

LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, R. C. **Manual para el Diagnóstico de enfermedades del Camarón**: USDA: 92 p. 2002.

LOH, P. C. et al. **Viral Pathogens of the penaeids shrimp**. Hawaii: Advances in Virus Researchs. 48: 263-312 p. 1997.

MARAMOROSCH, K.; MURPHY, F. A.; SHATKIN, A. J. **Advances in Virus Research**. USA: Academic Press. 48 1997.

MENDOZA CANOA, F. et al. **Prevalence of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in shrimp (*Penaeus vannamei*) broodstock in northwestern Mexico**. Mexico: Preventive Veterinary Medicine 117: 301-304 p. 2014.

MONTGOMERY-BROOK, D. et al. **Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water**. United States: Aquaculture. 265: 41-48 p. 2007.

MORALES COVARRUBIAS, M. S. **Enfermedades del Camarón:detección mediante análisis en fresco e histopatología**. México: Trillas: 180 p. 2010.

MORALES, V.; CUELLAR, J. **Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**. PANAMÁ: Programa CYTED Red II-D Vannamei 270 p. 2008.

NÉSTOR, A.; GABRIEL, N. **Libro Rojo de invertebrados marinos de Colombia**. Colombia: INVEMAR. Ministerio de Medio Ambiente 177 p. 2002.

OIE. **Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos** 2006.

OIE, **Código Acuático**. Código Sanitario para Animales Acuáticos. ANIMAL, O. M. D. S.: 28 p. 2016.

RAI, P. et al. **Genomics, Molecular Epidemiology and Diagnostics of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus**. Indian: Indian Journal of Virology. 23: 203-214 p. 2012.

RAMOS-CRUZ, S. **Aspectos Biológicos y Poblacionales del Camarón Blanco Litopenaeus vannamei (BOONE 1031) durante la veda del 2006 en el Golfo de Tehuantepec, México**. México: CICIMAR Oceanides 27: 11-24 p. 2012.

ROBLES-SIKISAKA, R. et al. **Genetic Signature of Rapid IHHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus) Expansion in Wild Penaeus Shrimp Populations**. San Diego, CA, US: PLoS ONE. 5: 11799 p. 2010.

RUÍZ SANDOVAL, L. A. **Importancia de la Acuicultura en México**. México: Biomasa XY: 6 p. 2013.

SAGARPA. **Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca** México: CONAPESCA-SAGARPA: 311 p. 2011.

SAGARPA-CONAPESCA. **ANUARIO ESTADISTICO DE ACUACULTURA Y PESCA 2013**. MEXICO: SAGARPA-CONAPESCA 2013.

SILVA, D. C. D. et al. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus from Brazil: Sequencing, comparative analysis and PCR detection. **Virus Research**, v. 189, p. 136-146, 2014.

SINDERMANN, C. J.; LIGHTNER, D. V. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**: ELSEVIER: 431 p. 1988.

SUN, Z.-F. et al. **Sensitive and rapid detection of infectious hypo dermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification.** China: ELSEVIER. 131: 41-46 p. 2006.

SÁNCHEZ P., A. et al. **Virus: Gran amenaza para el camarón.** México: Ciencia y Desarrollo, CONACyT 2010.

TAMAY DE DIOS, L.; IBARRA, C.; VELASQUILLO, C. **Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.** México. 2: 70-78 p. 2013.

TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. **Detection and quantification of infectious hypo dermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR:** Diseases of aquatic organisms. 44: 79-85 p. 2001.

TASSANAKAJON, A. et al. **Penaeus monodon gene discovery project: The generation of an EST collection and establishment of a database:** Gene. 384: 104-112 p. 2006.

TEIXEIRA, M. et al. **Differential diagnosis of active hypodermal and hematopoietic necrosis virus based on gene choice and reverse transcription coupled with PCR.** Brasil: Genetics and Molecular Research: 2025-2031 p. 2010.

TEIXEIRA-LÓPEZ, M. A. et al. **Natural co-infection with infectious hypo dermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious myonecrosis virus (IMNV) in Litopeneus vannamei in Brazil.** Brazil: Aquaculture: 212-216 p. 2011.

YANG, B. et al. **Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China.** China: Veterinary Microbiology 63-70 p. 2007.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>