

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA NECROSIS
HEPATOPANCREÁTICA (NHP) Y SU IMPACTO EN CULTIVOS DE CAMARÓN
Litopenaeus vannamei EN SONORA, MÉXICO.

Por

JOSE CUAUHTÉMOC IBARRA GAMEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Sanidad Acuícola

Diciembre de 2006

CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA NECROSIS
HEPATOPANCREÁTICA (NHP) Y SU IMPACTO EN CULTIVOS DE CAMARÓN
Litopenaeus vannamei EN SONORA, MÉXICO.

Comité de Tesis

Dr. Lucio Galavíz Silva

Director de Tesis

Dra. Zinnia Judith Molina Garza

Secretario

Dr. Roberto Mercado Hernández

Vocal

Dr. Gabino A. Rodríguez Almaraz

Vocal

Dr. Jesús Montemayor Leal

Vocal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA NECROSIS
HEPATOPANCREÁTICA (NHP) Y SU IMPACTO EN CULTIVOS DE CAMARÓN
Litopenaeus vannamei EN SONORA, MÉXICO.

Por

JOSE CUAUHTÉMOC IBARRA GAMEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Sanidad Acuícola

Diciembre de 2006

DEDICATORIA

A mi esposa, Gloria Quiroz Macias y a mis hijos Natalia y José Alberto, que son el motor para seguir adelante y cumplir una meta académica mas en mi vida, con respeto y cariño.

A mis padres Manuel Ibarra Peña (QPDE) y a la gran Keiko Ana Alicia Gámez de Ibarra, que no tengo palabras para agradecerle, ya que ha sido el pilar de esta gran familia.

A dios por permitirme una meta más en mi vida.

A mis hermanos, Víctor, Ana, Carlos, Alma, Martha, porque somos una familia muy unida y todos nos vemos con debido respeto.

A toda mi familia de convivencia: suegra, tíos, primos, cuñados, sobrinos y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Lucio Galavíz Silva Asesor de mi tesis. Así como a la Dra. Zinnia Judith Molina Garza, Dr. Roberto Mercado Hernández, Dr. Gabino Rodríguez Almaraz y al Dr. Jesús Montemayor Leal, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

Al Instituto Tecnológico de Sonora, por la oportunidad de realizar este trabajo.

Al señor rector de nuestra Alma Mater, Dr. Gonzalo Rodríguez Villanueva, por el apoyo en la realización de mis estudios.

A todo el personal del ITSON, que de alguna forma u otra me ayudaron para culminar mis estudios.

Al personal del laboratorio de Sanidad Acuícola del ITSON, Cecilia Luna, Iván Cárdenas y Angelita Contreras, que me ayudaron bastante en la toma de muestras y colectas en el campo y en el laboratorio.

A todos mis amigos y compañeros del Centro Nacional de Sanidad Acuícola, Dr. Francisco Iruegas, Dr. Narciso Salinas, Dr. Baldemar(Vaquero), Dr. Fernando Jiménez Guzmán, Dr. Feliciano Segovia, Margarita, Maria Elena, Mayra. Asunción, Lety, doña leito, doña Marina, y un agradecimiento especial para la Sra. Carmen Vázquez Peña, por su ayuda en los trámites académicos y administrativos.

Y sin faltar a mis amigos del laboratorio de Patología Molecular, QBP, José Reyes Gonzáles Galavíz, Ricardo, Luis, Christopher y el tremendo Abraham tinini.

Finalmente a todas aquellas personas que de alguna forma siempre estuvieron, alentándome a seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDO	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	x
1 RESUMEN	1
2 ABSTRACT	2
3 INTRODUCION	3
4 HIPÓTESIS	7
5 OBJETIVOS	8
5.1 Objetivo General	8
5.2 Objetivos particulares	8
6 IMPORTANCIA	9
7 ANTECEDENTES	10
7.1. Producción.	11
7.2. Nombre común.	11
7.3. Agente etiológico.	11
7.4. Hepatopancreas como órgano blanco	12
7.5. Especies afectadas.	12
7.6. Distribución geográfica.	12
7.7. Sintomatología.	13
7.8. Métodos de diagnostico.	13
7.9. Mortalidad.	15
7.10. Prevención- tratamiento.	16
7.11. Parámetros fisicoquímicos.	17
8 METODOLOGIA	18
8.1 Descripción del área de estudio.	18
8.2 Método de diagnóstico presuntivo de camarones.	21
8.2.1 Procedimiento.	23
8.2.1.1 Biometría.	23
8.2.1.2 Tiempo de coagulación.	23
8.2.1.3 Muestra húmeda de tejidos.	24

Sección	Página
8.2.1.4 Muestreo.	26
8.3. Método de diagnóstico histopatológico.	26
8.4 Método de hibridación <i>in situ</i> .	27
8.4.1. Preparación de la muestra.	28
8.4.2. Procedimiento.	28
8.5. Método de diagnóstico de enfermedades por reacción. en cadena de la polimerasa (PCR).	33
8.5.1. Extracción de Templado de DNA para PCR.	33
8.5.2. Selección de iniciadores para la reacción.	34
8.5.3. Control positivo.	34
8.5.4. Control negativo.	34
8.5.5. Amplificación del DNA.	35
8.5.6. Electroforesis en gel de Agarosa.	35
8.6. Método de microscopía electrónica de transmisión (MET).	36
8.6.1 Aislamiento de la bacteria NHP.	36
8.6.2. Tinción negativa (MET).	36
8.7 Purificación de DNA específico de la bacteria NHP.	37
8.7.1 Clonación de los productos purificados de PCR.	38
8.7.2. Purificación de los plásmidos.	38
8.7.3 Secuenciación genómica de productos clonados.	39
8.7.4. Análisis de las secuencias genómicas.	40
8.8. Parámetros fisicoquímicos.	40
9 RESULTADOS	41
9.1. Análisis en fresco.	41
9.2. Histopatología. (Hematoxilina & Eosina)	42
9.3. Hibridación <i>in situ</i> .	43
9.4. Análisis de PCR.	43
9.5. Análisis de Microscopía Electrónica.	43
9.6. Purificación de DNA específico de la bacteria NHP	44
9.7. Prevalencia-Parámetros fisicoquímicos.	46
10 DISCUSION	61
11 CONCLUSIONES	65
12 RECOMENDACIONES	68
13 LITERATURA CITADA	69
14 APENDICE	73
14.1. Preparación de reactivos para análisis de hibridación <i>in situ</i>	73

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Ubicación general de la zona de estudio.	20
2 Fotografía (A) de satélite con un acercamiento de una granja típica, panorámica (B) típico de una granja de camarón en Sonora.	20
3 Anatomía general externa del camarón peneido (Brown, 1993).	22
4 Anatomía general interna del camarón peneido (Brown, 1993).	22
5 Camarón <i>L. vannamei</i> con NHP donde se observan los pleopodos con una apariencia de melanización.	48
6 Camarón <i>L. vannamei</i> donde se puede observar una marcada atrofia del hepatopancreas el cual se encuentra reducido a un 50% de lo normal.	48
7 Preparación en húmedo de los diferentes órganos del camarón <i>L. vannamei</i> para su observación en microscopio de luz.	48
8 Preparación en húmedo del hepatopancreas de un camarón con NHP donde se observan túbulos hepatopancreáticos con necrosis.	48
9 Preparación en húmedo del hepatopancreas donde se observan los túbulos hepatopancreáticos normales. Grado 0.	49
10 Preparación en húmedo del hepatopancreas donde se observan los túbulos hepatopancreáticos con algunas deformidades. Grado 1.	49
11 Preparación en húmedo del hepatopancreas donde se observan los	

túbulos hepatopancreáticos con una ligera estrangulación. Grado 2.	49
12 Preparación en húmedo del hepatopancreas donde se observan los túbulos hepatopancreáticos con necrosis severa. Grado 3.	49
13 Preparación en húmedo del hepatopancreas donde se observan túbulos hepatopancreáticos con una cantidad de vacuolas lipidicas abundantes. Grado 0.	50
14 Preparación en húmedo del hepatopancreas donde se observan túbulos hepatopancreáticos con una cantidad de vacuolas lipidicas del 75%. Grado 1.	50
15 Preparación en húmedo del hepatopancreas donde se observan los túbulos hepatopancreáticos con vacuolas lipidicas al 50%. Grado 2	50
16 Preparación en húmedo del hepatopancreas donde se observan los túbulos hepatopancreáticos con ausencia de vacuolas lipicas. Grado 3.	50
17 Preparación en húmedo del epipodito de camarón donde se observa ausencia de parásitos epicomensales. Grado 0.	51
18 Preparación en húmedo del epipodito de camarón donde se observa una infestacion del 50% por parásitos epicomensales. Grado 1.	51
19 Preparación en húmedo del epipodito de camarón donde se observa una infestacion del 75% por parásitos epicomensales. Grado 2.	51
20 Preparación en húmedo del epipodito de camarón donde se observa	

- una infestacion del 100% por parásitos epicomensales. Grado 3. 51
- 21 Corte histopatológico de hepatopaneas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, donde se observan los túbulos hepatopancreáticos mostrando algunas células hepatopancreaticas basofilas e hipertrofiadas conteniendo organismos NHP, Tinción H&E, Aumentos 600X. 52
- 22 Corte histopatológico de hepatopaneas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, una marcada necrosis en los túmulos hepatopancreáticos, cambios en las células hepatopancreaticas y una dilatación tubular debido fuerte infección de bacterias conocidas como necrosis hepatopancreatica bacterium (NHP). Tinción H&E. Aumento 100X. 52
- 23 Microfotografía de hepatopaneas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, demostrando la presencia de la bacteria NHP, se realizó una prueba de hibridación *in situ*, con una sonda genética marcada con DIG y especifica para NHP, las masas intracitoplasmatica 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 DGI. Aumento, 400X. 52
- 24 Magnificación de la microfotografía de hepatopaneas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, demostrando la presencia de la bacteria NHP, se realizo una prueba de hibridación *in situ*, con una sonda genética marcada con DIG y especifica para NHP, las masas intracitoplasmatica 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 DGI. Aumento, 600X. 52
- 25 Gel de agarosa al 1%, carril 1: marcador de bp Lader 100, carril 2: control positivo de DiagXotics^R Inc. que amplifica a 312 bp, carril 3: PCR múltiplex amplificando a 506 bp para tejido de un camarón sano y a 312bp para el DNA de NHP, carril 4, 5, 6, 7,8: muestras positivas de las granjas camaronicolas seleccionadas. A. Acuícola, Desheredados, Gygyso. A. Lobos. La loma de Félix, respectivamente, amplificando a 209 bp, carril 9: marcador de bp Ladder 100. 53
- 26 Micrografía electrónica de transmisión (MET) tomada bajo tinción negativa en purificados bacterianos NHP donde se observan las dos formas de esta bacteria. 54
- 27 Micrografía electrónica de transmisión (MET) tomada bajo tinción negativa en purificados bacterianos NHP donde se observan las dos formas de esta bacteria. 54
- 28 Amplicones de 209 pb de NHP completamente purificado. Carril M, Marcador molecular de 100 pb, 1 Acuícola Lobos 2, Loma de Félix 3, Desheredados 4, Acción Acuícola. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. 55
- 29 Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio que muestra los insertos de clonación de 209 pb amplificados por PCR y específicos para NHP. Carril M) marcador molecular de 100 pb, 3) Acuícola Lobos, 4) Acción Acuícola. 55

30	Electroforesis que muestra los productos de clonación purificados. Plásmidos listos para su secuenciación: carril 2) Acuícola lobos, 8) Acción acuícola; plásmidos descartados para ser secuenciados, carril: 4) Acuícola lobos 6) Acción acuícola. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.	56
31	Resultados de la comparación Blast entre la muestra 21 y la NHP reportada en el banco de genes.	57
32	Resultados de la comparación Blast entre la muestra 622 y la NHP reportada en el banco de genes.	57
33	Resultados de la alineación CLUSTALW entre la muestra 21 y la NHP reportada en el banco de genes, donde se observa la sustitución de la G por la A.	58
34	Resultados de la alineación CLUSTALW entre la muestra 622 y la NHP reportada en el banco de genes.	58
35	Gráfica de la temperatura promedio matutina (TAM-6:00 hrs) y vespertina (TPM-18:00 hrs) semanal de La granja Acuícola Lobos 2004.	59
36	Gráfica de la oxígeno promedio matutino (TAM-6:00 hrs) y vespertino (TPM-18:00 hrs) semanal de La granja Acuícola Lobos 2004.	59
37	Gráfica de la salinidad promedio (12:00 hrs) semanal de La granja Acuícola Lobos 2004.	60
38	Gráfica del pH promedio (12:00 hrs) semanal de La granja Lobos 2004.	60

LISTA DE TABLAS

Figura	Página
I. Producción mexicana de camarón en peso vivo Enero-diciembre 2004 (en toneladas).	4
II. Relación de granjas afectadas por el virus de la mancha blanca (WSSV), necrosis hepatopancreatica (NHP) y virus del Taura (TSV), en las juntas locales de Sanidad Acuícola (JLSA) en el estado de Sonora. Ciclo.	5
III. Esquema generalizado, para la asignación de un valor numérico cualitativo a los grados de severidad de infecciones y síndromes	21
IV. Relación de granjas estudiadas, así como la cantidad de organismos seleccionados por cada técnica de diagnostico diferente. Necrosis hepatopancreatica (NHP), Hematoxilina & Eosina (H&E), Hibridación <i>in situ</i> (ISH), Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Microscopia electrónica de transmisión (MET).	41
V. Comparación de las medidas morfológicas de la bacteria NHP, Analizadas en el Microscopio Electrónico de Transmisión.	44
VI. Porcentaje de prevalencia de NHP en granjas de camarón del Sur del estado de Sonora de mayo a octubre del 2004.	47

1 RESUMEN

La necrosis hepatopancreatica (NHP) es una seria enfermedad que afecta los cultivos de camarón *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931, desde Texas hasta Centro y Sudamérica. En este trabajo se realizó el primer monitoreo sistemático durante el ciclo 2004 en seis granjas de Sonora, debido a la falta de estudios sobre infecciones causadas por rickettsias en *L. vannamei*. El diagnóstico presuntivo se efectuó por microscopia de luz (ML, análisis en fresco y cortes histológicos con hematoxilina y eosina) y el confirmativo se basó en el aislamiento de la bacteria por gradientes de Percoll, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y tinciones negativas al microscopio electrónico de transmisión (MET), para diferenciar esta de la vibriosis. Por ML, los hepatopancreas presentaron atrofia, estrangulamiento y necrosis en túbulos hepatopancreáticos con masas de bacterias NHP, infiltración hemocítica y melanización. Por PCR se amplificaron productos de 209 pb correspondientes a una región específica del 16S rDNA de la rickettsia NHP. Al MET, se registró la presencia de bacterias pleomorfas, ovoides a cilíndricas (0.2 µm de ancho x 0.6 µm a 0.9 µm de longitud), con menor frecuencia se presentaron formas helicoidales, con siete a doce giros o torciones (0.23 µm x 2.43 a 5.27 µm). La aplicación de herramientas de diagnóstico tradicional y molecular, permitieron identificar con certeza al agente causal de las epizootias en Sonora como la bacteria NHP y descartar etiologías similares como las ocasionadas por bacterias del género *Vibrio*. Las prevalencias más altas se observaron en la granja Lombardo Acuícola (86%) y la más baja en Acción Acuícola (14.2 %), con salinidades entre 42 a 45.5 ppt.

2 ABSTRACT

Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP) is a severe disease of farm raised white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 from Texas to Central and South America. On this study, the first systematic monitoring for NHP in six shrimp farms located in Sonora was performed during the 2004 culture cycle, mainly by the scarcity of studies over rickettsial infections in *L. vannamei*. Presumptive diagnosis was based in light microscopy (LM, wet-mounts and H&E stained sections of hepatopancreata) while confirmative identification were realized by isolation of the bacteria in Percoll gradients, polymerase chain reaction (PCR) and negative stains for transmission electron microscopy (TEM), looking for differentiate NHP from bacteria genus *vibrio*. By ML, atrophy of the hepatopancreas, necrosis of the hepatopancreatic tubules filled with masses of the NHP bacterium within the tubular epithelium, together with hemocytic infiltrates and tubular melanization were observed. By PCR, products of 209 bp, which correspond to a specific region of 16S rDNA of the rickettsia NHP were amplified. By TEM, pleomorphic ovoid to rod-shaped bacteria (0.2 x 0.6-0.9 μm) and helical forms with seven to twelve spiral turns (0.23 x 2.43-5.27 μm), were observed. Application of traditional and molecular diagnostic tools, allowed to identify exactly the causative agent of the epizootic mortalities as the bacterium NHP, whth higher prevalence registered in Lombardo Acuícola (86 %) and lower in Accion Acuícola (14.6 %), where the salinities reached 42 to 45.5 ppt.

3 INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón en el mundo se lleva a cabo en aproximadamente 80 regiones costeras en alrededor de un millón de hectáreas y una producción de un millón de toneladas métricas, donde los países asiáticos aportan el 75% de la producción y el resto en el continente Americano (Lightner, 2005), teniendo México el tercer lugar en producción en Latinoamérica, seguido de Ecuador y Brasil. En términos de significancia solo hay dos especies de camarón que predominan en los cultivos de América, el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931, con un 90% del total de la producción y la segunda especie mas importante es el camarón azul del pacifico *Litopenaeus stylirostris* (Lightner,2005), Sí bien es cierto que la camaronicultura ha tenido un desarrollo muy rápido pero también la evolución de las enfermedades ha sido de la misma intensidad, tan solo en los países Asiáticos han tenido perdidas de billones de dólares en los últimos años por lo que es importante mencionar que los patógenos mas devastadores en el continente americano son nativos de los países asiáticos.

El cultivo de camarón en México ha tenido un crecimiento acelerado desde la pasada década, para el 2005 se registran 86,000 toneladas métricas en una área aproximada de 45,000 hectáreas distribuidas principalmente en los estados de Sinaloa, Sonora, Nayarit, y Tamaulipas, entre otros (Tabla I).

Tabla I
Producción mexicana (en toneladas) de camarón en peso vivo, enero-diciembre 2004
(Gutiérrez, 2005).

Año	Totales	Altamar	Bahías y esteros	Cultivo
1990	46,585	22,989	19,225	4,371
1991	48,155	24,049	18,955	5,111
1992	49,986	22,483	19,177	8,326
1993	57,579	25,428	20,305	11,846
1994	59,482	26,411	19,933	13,138
1995	67,482	29,691	21,924	15,867
1996	61,235	25,914	22,207	13,114
1997	70,144	28,614	23,960	17,570
1998	71,609	27,839	20,795	22,975
1999	79,066	27,683	22,314	29,120
2000	94,777	37,580	24,017	33,180
2001	105,523	37,891,	19,618	48,014
2002	100,466	32,914	22,410	45,833
2003	110,000	30,000	13,000	67,000
2004	120,000	28,000	14,000	78,000

Sin embargo, en los últimos cinco años se han tenido problemas en la producción debido a diferentes enfermedades de tipo viral y bacteriano.

En Sonora, la camaricultura comercial inició en 1987 con alrededor de 340 hectáreas, teniendo un crecimiento acelerado; en el año de 1998 se contaba con 4,600 hectáreas, llegando a tener 15,300 hectáreas en el 2003. En la región sur de Sonora, en los 2001- 2003 la industria sufrió pérdidas económicas entre el 50-60%, ocasionado por problemas de tipo patológico, que ocasionan mortalidades promedios del 50%, esto es debido principalmente al virus de la mancha blanca combinado con la rickettsia, causante de la necrosis hepatopancreática NHP. En el Estado de Sonora, en el ciclo 2005, se operaron alrededor de 127 granjas en un área de 17,000 hectáreas, detectándose el virus de la mancha blanca (White Spot Síndrome Virus=WSSV) en 85

granjas equivalente al 67%, mientras la bacteria que causa la necrosis hepatopancreatica (NHP), se detectó en 65 granjas, equivalente al 50% del total de las granjas, teniendo una pérdida estimada, por la combinación de los dos patógenos, en alrededor de 15,000 toneladas métricas equivalentes aproximadamente a 80 millones de pesos, (www.cosaes.com.mx). Por este motivo se puede afirmar que la necrosis hepatopancreatica es una enfermedad de importancia similar, en cuestión de incidencia, al WSSV, ya que se detectó en más del 50% de las granjas en Sonora (Tabla II).

Tabla II

Relación de granjas afectadas por el virus de la mancha blanca (WSSV), necrosis hepatopancreatica (NHP) y virus del Taura (TSV), en las juntas locales de Sanidad Acuícola (JLSA) en el estado de Sonora. Ciclo 2005. www.cosaes.com.mx.

JLSA	G R A N J A S			
	Granjas operando	Detectadas WSSV	Detectadas NHP	Detectadas TSV
Agiabampo	3	0	2	0
Santa Bárbara	2	0	1	0
Riito	9	9	3	1
Aquiropo	7	6	4	0
Siari	5	14	4	0
Tóbari	15	15	10	0
Atanasia	23	19	7	0
Mélagos	24	24	7	0
Lobos	5	2	3	0
Cruz de Piedra	6	2	2	0
Guaymas	1	0	1	0
Tastiota	7	2	4	0
Cardonal	7	2	6	0
Caborca	1	0	1	0
Bahía Kino	12	0	10	0
Totales	127	85	65	1

La mayoría de las enfermedades que han sido introducidas de otros países se han presentado posiblemente por (1) la importación y empacamiento de camarón en plantas procesadoras cercanas a las alguna granja que drenan el agua de desecho sin ningún tratamiento y propaga los agentes infecciosos causando enfermedades por varios factores, como la introducción del virus en el medio ambiente donde residen poblaciones susceptibles, aumento de la virulencia, cambió en el modo de transmisión, cambios en la susceptibilidad del hospedero, cambios ambientales bruscos y el sistema inmune deprimido, esto hace que sea mas susceptible a desarrollar la enfermedad. (2) el segundo mecanismo es la entrada de crustáceos (portadores de patógenos) silvestres a los sistemas de cultivo.

Para controlar la diseminación de enfermedades y epizootias en la acuicultura, es vital que se considere de máxima prioridad poner en marcha métodos y técnicas que permitan obtener un rápido diagnóstico y cuando sea factible, el reconocimiento temprano de los posibles agentes etiológicos en la población y/o en el ambiente con el objetivo de detener los efectos negativos que se presentan en el cultivo.

En la actualidad, el gran impulso que ha tomado la camaronicultura, no ha sido igual al desarrollo de la sanidad acuícola, por lo que existe la necesidad de enfrentar la problemática del diagnostico oportuno de las enfermedades con la finalidad de prevenir o controlar las epizootias en los organismos cultivados.

4 HIPÓTESIS

El presente estudio demostrará que mediante diferentes técnicas, de diagnóstico, el agente etiológico que causa la necrosis hepatopancreática NHP, se encuentra distribuido en los cultivos de camarón en la región de Sonora, causando pérdidas económicas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar oportunamente la presencia de la bacteria causante de la necrosis hepatopancreática NHP en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cultivado en granjas de Sonora mediante diferentes técnicas de diagnóstico, con el fin de prevenir y controlar las epizootias en los estanques.

5.2 Objetivos particulares

Caracterizar el agente etiológico, causante de la necrosis hepatopancreática NHP en camarones de cultivo *Litopenaeus vannamei* mediante diferentes técnicas de diagnóstico (Análisis en fresco, histopatológicas, moleculares y ultraestructurales).

Purificar, clonar, secuenciar y comparar la región génica 16S r-DNA de la NHP, que infecta a camarones *Litopenaeus vannamei* en México con las descritas en Texas y Perú.

6 IMPORTANCIA

Debido a la falta de estudios sobre infecciones causadas por NHP en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cultivado en México, este trabajo se enfoca a realizar el primer monitoreo sistemático para la identificación y caracterización de esta bacteria. Mediante exámenes en fresco, histopatológicos y el diagnóstico confirmativo por PCR, seguido por la purificación del agente causal por ultra centrifugación diferencial y análisis al microscopio electrónico de transmisión (MET).

En los últimos tres años esta bacteria ha causado mortalidades de arriba del 30% en el ciclo de cultivo, con una pérdida económica de aproximadamente 20 millones de pesos, tan solo en el estado de Sonora.

7 ANTECEDENTES

7.1. Producción.

En México, el camarón cultivado es una industria muy importante por la generación de empleos en zonas no productivas para la agricultura. Actualmente existen 402 granjas en una área estimada de 43,500 ha y una producción de 86,000 toneladas métricas anuales. La mayoría de las granjas se concentran en Sinaloa, Sonora, Nayarit y Tamaulipas, entre otras, (Gutiérrez ,2005).

Como los signos clínicos no son específicos, el diagnóstico presuntivo se basa en el examen en fresco. Para el diagnóstico confirmatorio se requiere del uso de sondas génicas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o microscopía electrónica de transmisión (MET), lo cual es difícil realizarlo en un laboratorio convencional o en el campo. Probablemente por este motivo, no existen evidencias en México de la distribución de la NHP en el estado de Sonora, donde se encuentra el mayor número de granjas de camarón, o quizá se enmascare con otras patologías de similar importancia, como son las enfermedades virales.

El reconocimiento temprano de la enfermedad es la clave para un tratamiento exitoso, pues el canibalismo posiblemente juegue un papel importante en la amplificación y transmisión de la enfermedad (Frelie *et al.*, 1992). Esta enfermedad afecta el hepatopancreas y los signos clínicos incluyen tracto digestivos vacíos (anorexia), letargia, flacidez de abdomen con cutículas blandas.

7.2. Nombre común.

Hepatopancreatitis necrotizante (NHP), hepatopancreatitis necrotizante de Texas (TNHP), síndrome de mortalidad de estanques en Texas (TPMS) o hepatopancreatitis necrotizante de Perú (PNHP).

7.3. Agente etiológico.

La posición taxonómica del NHP ha sido determinada y se infiere que las bacterias son un nuevo género dentro de las alfa Proteobacterias (Frelie *et al.*, 1994). Las bacterias NHP son pequeñas, Gram negativas, altamente pleomórficas y patógenos intracelulares obligados de células epiteliales del hepatopáncreas. Existen dos variantes morfológicas distintas de bacterias TNHP que se presentan en las células infectadas del hepatopáncreas: bacteria bacilar tipo rickettsial de 0.3 x 9µm. La forma helicoidal posee ocho flagelos en el ápice basal de la bacteria y un flagelo adicional (posiblemente dos) en la cresta de la hélice (Krol *et al.*, 1991). La etiología de la NHP, según estudios histopatológicos y ultraestructurales, residen y se multiplican en células epiteliales del hepatopáncreas de camarones infectados (Krol *et al.*, 1991; Lightner *et al.*, 1992; Loy *et al.*, 1996). Así mismo, los estudios moleculares basados en el análisis de la secuencia del 16S rDNA, identificaron al agente etiológico como un miembro de la subclase α de las Proteobacteria y también, los análisis de las regiones variables V5, V8 y V9, así como la secuencia genética ribosomal 16 S, permitió diseñar técnicas moleculares de diagnóstico basados en PCR.

7.4. El hepatopancreas como órgano blanco de NHP.

A la glándula del intestino medio también se le llama hepatopancreas el color puede variar desde marrón, verde amarillo, rojo, azul o rosado y depende básicamente de las reservas almacenadas. Los pigmentos presentes incluyen beta-caroteno, zeaxantina y aztaxantina; Lleva a cabo la degradación química de los alimentos que se realiza gracias a la acción de enzimas digestivas procedentes principalmente de esta misma glándula ya que cumple varias funciones como son: secretoras de enzimas digestivas, retención temporal y cíclica de reservas y principal órgano de absorción de los productos de la digestión. Esta formado por una serie de túbulos ciegos que vierten por el extremo abierto, sus productos de secreción, posee de 2-3 lóbulos bien diferenciados. Se comunica con el estomago a través de dos ductos principales y estos se dividen en conductos secundarios y terciarios que terminan en túbulos pequeños o divertículos. Estos túbulos constituyen la masa glandular.

7.5. Especies afectadas.

A la fecha las infecciones por NHP han sido observadas solamente en los peneidos de Latinoamérica: *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus aztecus*, *L. setiferus*, *L. stylirostris* y *F. californiensis*.

7.6. Distribución geográfica.

El NHP fue reconocido inicialmente en cultivos de camarones peneidos en Texas, y la presencia de bacterias similares, más no idénticas, han sido encontradas y asociadas con serias enfermedades epizoóticas en granjas camaronícolas de Perú, Ecuador, Venezuela, Brasil, Panamá y Costa Rica (Lightner,1996).

La NHP ha sido reconocida en países latinoamericanos de las costas atlánticas y pacíficas en *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris* principalmente, también se reportó en *P. aztecus*, *P. californiensis* y *P. setiferus* (Frelier y Loy, 1997). Datos de sobrevivencia obtenidos en granjas de producción comercial sugieren que la enfermedad clínica y la mortalidad asociada es mayor en *L. vannamei* cuando se compara con *L. stylirostris*, causando de un 20 a un 90% de pérdidas de cosecha al año (Frelier *et al.*; 1992, Lightner 1996). Las pruebas moleculares de bacterias aisladas, tanto en América del Sur como del Norte, han indicado que son semejantes (Loy *et al.*, 1996).

7.7. Sintomatología.

Se puede presentar una combinación de los siguientes síntomas, reducción en la tasa alimentación, anorexia e intestinos vacíos, elevadas tasas de conversión alimenticia; cutícula flácida, branquias oscurecidas y expansión de cromatóforos dando una apariencia oscura en los pleopodos y urópodos. Adicionalmente, aparece una gran cantidad de epibiontes en la superficie de los camarones y presencia de lesiones provocadas por bacterias. También se puede observar letárgia y atrofia marcada del hepatopáncreas el cual presenta un color de normal a naranja pálido con porciones melanizadas o edematosas.

7.8. Métodos de diagnóstico.

Histológicamente el hepatopáncreas se muestra atrofiado, lesiones granulomatosas con la presencia de un gran número de bacterias pequeñas, intracelulares y Gram negativo en los túbulos de las células de los epiteliales. La tinción modificada de Steiner en hepatopáncreas afectado, muestra masas intracelulares de pequeñas bacterias libres en el citoplasma. A través de MET, se pueden observar las bacterias en las células

del hepatopáncreas. El análisis por PCR e hibridación *in situ* de la región 16S RNA, permitió diferenciar a RLB de NHP (Nunan *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el agente etiológico de la NHP únicamente infecta las células epiteliales de los túbulos hepatopancreáticos. No ha sido demostrado que puedan infectar otro tipo de células (Loy *et al.*, 1996). Un microorganismo rickettsial aún sin clasificar, pero diferente al agente etiológico de la NHP, se reportó en un solo caso de *L. vannamei* cultivado en México, (Lightner, 1996). Así mismo, otros casos recientes de bacterias similares a rickettsias, llamados RLB (rickettsia-like bacterium) han sido identificados en cultivos de *Penaeus monodon* cultivado en Madagascar, donde ha causado severas mortalidades en el año de 1999. El hepatopáncreas en camarón es un órgano que tiene como función la digestión de la comida, absorción y almacenamiento de nutrientes. El crecimiento y proliferación de NHP en las células hepatopancreáticas está asociado con rangos de mortalidad que oscilan del 20 al 95% (Lightner, 1996).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método para amplificar segmentos específicos de DNA que pueden ser usados para detectar bacterias patógenas (Carl *et al.*, 1990; Hoshina *et al.*, 1990; Ehrlich *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1992). El PCR es un ensayo extremadamente útil, rápido, sensible y específico para detectar la presencia de bacterias que aún no han sido cultivadas en especímenes clínicos, sin embargo, tiene sus limitaciones este es el método de confirmación más usado para la detección de NHP.

Loy y Frelier, (1996), detectaron el agente etiológico de NHP en cultivos de *L. vannamei* mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa. Amplificaron un segmento definido del gen 16S rRNA ribosomal usando primers específicos para las regiones variables (V5, V8 y V9), pf-1 5' ACG TTG GAG GTT CGT CCT TCA G 3',

pr-1 5' TCA CCC CCT TGC TTC TCA TTG T 3', pr-2 5' CCA GTC ATC ACC TTT TCT GTG GTC 3' , utilizando como templado DNA extraído de tejido de camarones, obtenidos de dos regiones diferentes (Norte y Sur América), obteniendo segmentos de 660 y 441 bp específicos de bacteria NHP de 16S rDNA. Adicionando el análisis de RFLP a los productos y comparándolos con productos obtenidos de muestras purificadas en gradiente de sucrosa de la bacteria NHP previamente usadas para reproducir la enfermedad (Frelie *et al.*, 1993). Recientemente Briñez *et al.*, (2003), diagnosticaron la presencia de NHP en *L. vannamei*, desarrollando un método basado en PCR utilizando DNA purificado de muestras fecales infectadas como templados, para tal motivo utilizan primers específicos para la región 16S del gen RNA ribosomal (pf-1 1:5 ACG TTG GAG GTT CGT CCT TCA-g 3' / pr- 2:5' TCA CCC CCT TGC TTC TCA TTG T 3'), para confirmación, amplificaron DNA extraído de tejido incluido en parafina, obteniendo como resultados positivos segmentos de 440 bp.

7.9. Mortalidad.

La enfermedad puede causar una elevada tasa de mortalidad que alcanza el 90% durante los primeros 30 días de haberse presentado las señales clínicas. La temperatura y la salinidad son factores medioambientales que tienen una función muy importante en el desarrollo de NHP. Estudios epizootiológicos llevados a cabo en Texas, mostraron que en periodos prolongados de altas temperaturas (29 a 31° C) y elevadas salinidades (20 a 40 g/l) se observa el desarrollo de la enfermedad. Casos similares se presentaron en Perú, Venezuela, Brasil, Ecuador, Costa Rica y Panamá.

7.10. Prevención y tratamiento.

Las medidas de prevención recomendadas son el evitar la introducción de camarones infectados con NHP a los sitios de cultivo; instaurar cuarentenas de poblaciones con signos clínicos, una cuidadosa vigilancia de portadores potenciales, así como la destrucción de stocks infectados cuando sean detectados, seguidos de una desinfección de las áreas contaminadas. Este conjunto de acciones se debe considerar como la primera línea de defensa, cuando el patógeno sea detectado en poblaciones cultivadas, (Frelier, 1992).

Para el tratamiento de la NHP clínica se ha probado la eficacia de la oxitetraciclina en el alimento medicado (Frelier *et al.*, 1995). El reconocimiento temprano de la enfermedad es la clave para un tratamiento exitoso, pues el canibalismo juega un papel importante (Frelier *et al.*, 1992). No se ha observado resistencia a la oxitetraciclina cuando se ha suministrado entre 3 a 5 partes por millón (ppm), en los alimentos durante 14 días (Frelier *et al.*, 1994). El fracaso en el tratamiento de esta enfermedad puede ser atribuido (1) al diagnóstico incorrecto de la etiología primaria; (2) infecciones mixtas en el estanque; (3) tratamiento o dosis insuficientes por periodos muy cortos y (4) la aplicación de oxitetraciclina degradada.

Actualmente no se han identificado vectores u hospederos en los estanques infectados con esta rickettsia. Aunque es necesario seguir investigando ya que el análisis de postlarva infectadas sugiere que la transmisión vertical (de progenitores a la progenie) no ocurre. Frelier (1992), menciona que es importante continuar investigando para desarrollar prácticas de manejo del cultivo para reducir las pérdidas por NHP, actualmente, el mejor indicador clínico ha sido el examen en fresco del hepatopancreas.

7.11. Parámetros fisicoquímicos.

Clifford y Scura (2005), mencionan que en países en los que el virus WSSV esta ausente, o no virulento, es debido a que las temperaturas en el agua de los estanques son superiores a los 30-31 °C, pero el virus del síndrome de Taura (Taura síndrome virus=TSV) y la necrosis hepatopancreatica (NHP), son frecuentemente las enfermedades que mas predominan en este rango de temperatura. Por eso desarrollaron variedades resistentes a NHP usando como base genética sus líneas ya establecidas resistentes a TSV, que ahora designan como líneas de camarones resistentes a múltiples patógenos (RMP).

Boyd (1990), menciona algunos rangos ideales, para el cultivo de *Litopenaeus vannamei*, tales como temperatura del agua de 26-28 °C, salinidad de 15-25 g/l; pH, de 6.5- 9.0, alcalinidad de 200 ppm. Clifford (1997), menciona también algunos rangos de parámetros fisicoquímicos óptimos, como temperatura 28-32 °C, oxígeno disuelto 3.0 - 6.0 ppm, salinidad de 14 - 45 g/l, pH entre 8.1-9.0, rango de alcalinidad de 100 a 140 ppm, disco de Secchi de 35-45 cm de profundidad, amonía total de 0.1-1.0 ppm, amonía no ionizada menor a 0.1 ppm., sulfato de hidrogeno 0.10 ppm., nitrito 0.10 ppm., nitrato 0.4-1.4 ppm., nitrógeno orgánico 0.5-2.0 ppm., clorofila -a 50-75 ppm., sólidos totales en suspensión 50-150 ppm., De la Cerda (1999), reportó que la temperatura en granjas del sur de Sonora, durante el ciclo de cultivo, oscilo entre los 30.3-32.4 °C y el oxígeno disuelto en el agua 4.0-4.7 ppm., la salinidad varió de los 35 a 39 gramos por litro, la dureza del agua tuvo un promedio de 743.0 ppm., en este ciclo se obtuvieron buenas producciones record de 3750 toneladas por hectárea.

8 METODOLOGIA

8.1 Descripción del área de estudio.

El área de estudio comprendió seis granjas camaronícolas (Acción Acuícola, Desheredados, Gygyso, Acuícola Lobos, Loma de Félix y Lombardo Acuícola), localizadas en la parte sur del estado de Sonora, aproximadamente a 70-120 Km. de Cd. Obregón. Estas granjas están ubicadas entre los 110° 16' y 110° 13' de Longitud Oeste y los 27° 08' y 27° 10' Latitud Norte (Fig. 1, 2). Durante el ciclo de cultivo de Marzo-Octubre de 2004, Se analizaron 648 ejemplares de *Litopenaeus vannamei*, en las seis granjas de camarón seleccionadas, al total de las muestras se les realizaron análisis en fresco, 52 muestras para cortes histológicos con hematoxilina eosina (H&O), 41 muestras para análisis de hibridación *in situ*, 41 muestras para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y 41 muestras para análisis al microscopio electrónico de transmisión (MET).

Los camarones fueron seleccionados mediante un muestreo continuo en los estanques donde se reportaron mortalidades, los organismos moribundos o con signos microscópicos indicativos de NHP fueron trasladados al laboratorio para su análisis en fresco. Se tomó una muestra representativa del 10% por cada granja, para realizar los siguientes análisis, una parte de las muestras de hepatopancreas se fijaron en solución Davidson's AFA, para su análisis histopatológicos e hibridación *in situ*, otra parte se preservaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se transportaron al Laboratorio de Patología Molecular, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma

de Nuevo León, para la realización de los diferentes análisis de diagnóstico molecular confirmativo, análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y análisis de microscopía electrónica de transmisión (MET).



Fig.1. Ubicación general de la zona de estudio.

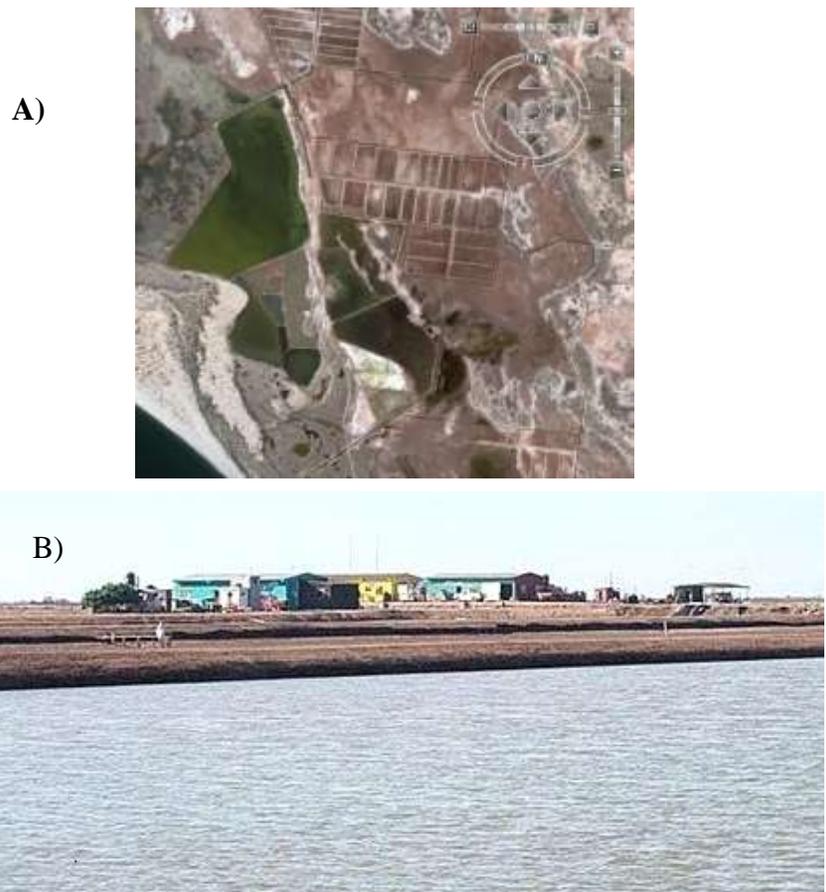


Fig. 2. A) fotografía de satélite con un acercamiento de una granja típica ,B). Panorámica típica de una granja de camarón en Sonora.

8.2 Método de diagnóstico presuntivo de camarones (análisis en fresco).

El examen en fresco se fundamenta en la observación visual e *in situ* de ejemplares vivos o moribundos, después de lo cual se procedió a disectar los camarones para llevar a cabo un estudio detallado de los signos que puedan indicar la presencia de determinados tipos de problemas patológicos en los mismos. Para esto se consideraron los criterios descritos por Lightner (1996) (Tabla III), donde divide cinco grados de severidad, dependiendo de los signos clínicos observados en el camarón.

Tabla III.

Esquema generalizado, para la asignación de un valor numérico cualitativo a los grados de severidad de infecciones y síndrome. (Lightner, 1996).

GRADO DE SEVERIDAD	SIGNOS CLÍNICOS
0	No presentan signos de infección por patógenos, parásitos o epicomensales. No presentan lesiones características de síndromes.
1	Presencia muy baja de patógenos, parásitos o epicomensales. En aquellos donde se tiene un número estándar permitido, éste se encuentra justo arriba del límite normal. Se observan muy pocas lesiones características del síndrome.
2	Se observa la presencia baja y moderada de patógenos, parásitos o epicomensales. Se observan muchas lesiones características del síndrome. Incremento en la mortalidad si no se aplica tratamiento (cuando existe tratamiento).
3	Se observa la presencia moderada de patógenos, parásitos o epicomensales. Se observan muchas lesiones características del síndrome. Potencialmente letal si no se aplica tratamiento (cuando existe tratamiento).
4	Se observan gran cantidad de patógenos, parásitos o epicomensales. Se observan severas lesiones características del síndrome. Muy letal con altas mortalidades.

Se señalan en las Fig. 3 y 4 los principales caracteres anatómicos y morfológicos externos e internos de un ejemplar adulto de un camarón peneidos de acuerdo a Brown, (1993).

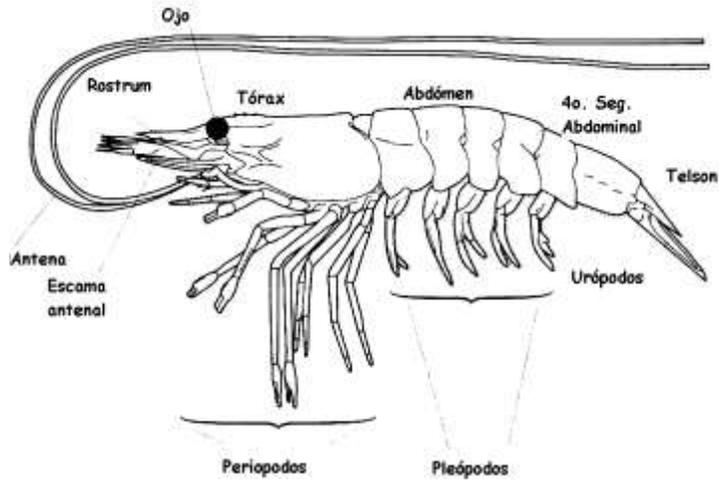


Fig. 3. Anatomía general externa del camarón peneido (Brown, 1993).

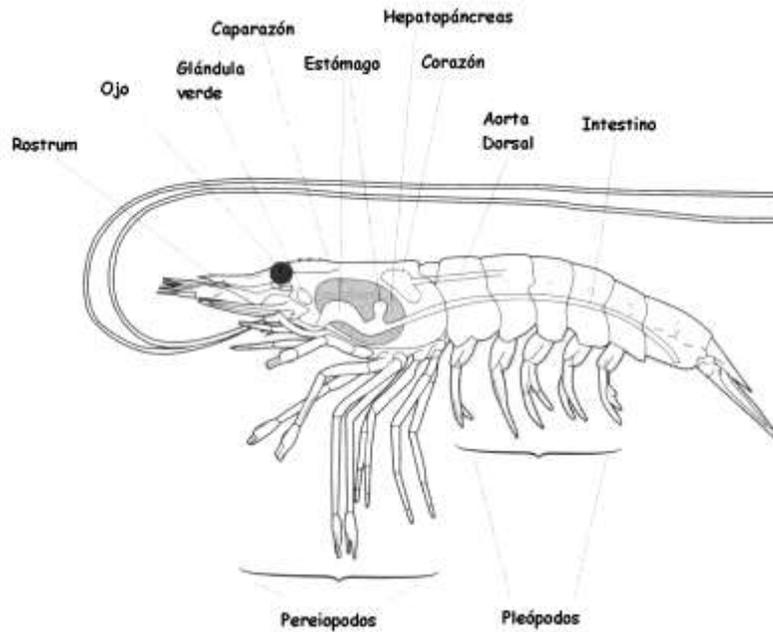


Fig. 4. Anatomía general interna del camarón peneido (Brown, 1993).

8.2.1 Procedimiento.

8.2.1.1 Biometría.

- Los camarones se midieron del rostrum al telson y se pesaron para conocer la talla y peso promedio.
- Se examinó el exoesqueleto. Una textura blanda, podría indicar una reciente muda, un problema de deficiencia nutricional o una incipiente invasión microbiana.
- A veces los camarones pueden presentar una flexión dorsal de liviana a moderada, a nivel del tercer segmento abdominal. Este signo ha sido reportado para peneidos afectados por la septicemia bacteriana o infestados por el ciliado colonial *Zoothamnium sp.* La presencia de áreas erosivas y marrones en el exoesqueleto, frecuentemente comenzando como pequeños puntos circulares, así como la presencia de puntos marrones, tal vez con bordes blancos y con los centros hundidos en el exoesqueleto, son indicativas de la “enfermedad del caparazón” o “enfermedad de las máculas oscuras”, una infección de etiología mixta provocada por bacterias quitinolíticas y en la cual a menudo intervienen los hongos.

8.2.1.2 Tiempo de coagulación

- Después de la extracción de la hemolinfa del camarón, se añadió una gota al portaobjetos.
- Se toma el tiempo y se mueve lentamente el portaobjetos.
- Se registra el tiempo cuando las gotas de hemolinfa comiencen a gelatinizarse.

- Tiempo tomado = tiempo de coagulación

8.2.1.3 Muestra húmeda de tejidos.

- Se selecciono una pequeña porción de cada tejido u órgano. Cada porción se colocó en portaobjetos separados limpios, y se les adicionan unas gotas de solución salina al 2% y el cubreobjetos, procurando evitar la formación burbujas que puedan interferir, para ello hay que realizar una leve presión sobre el cubreobjetos con la pinza de disección. Las muestras analizadas fueron:
- Branquias: Con pinzas finas se colocó una pequeña porción de filamentos y se examinó para buscar: cuerpos de inclusión viral, epibiontes (*Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Acineta* sp., *Bodo* sp., etc.), hongos, bacterias, melanizaciones, deformaciones y necrosis, entre otras.
- Aquellos camarones que se encuentran fuertemente infestados por bacterias filamentosas suelen tener branquias con una coloración amarillento-marrón o verdosa, según el tipo y color del detritus que haya sido atrapado entre los tricomas de las bacterias filamentosas adheridas a la superficie branquial externa.
- En casos donde ocurre melanización y necrosis de las branquias, esto se debe frecuentemente a infecciones provocadas por *Fusarium solani* u otros tipos parecidos a hongos imperfectos, la detección de macroconidios, típicamente con forma de canoa, en preparados frescos de las branquias es de gran importancia diagnóstica para ese tipo de micosis.
- Hepatopáncreas: Se eliminó todo el exoesqueleto del cefalotórax para descubrir el hepatopáncreas y el estómago. Se observó la coloración y el tamaño del

hepatopáncreas para ver si hay atrofia o hipertrofia de éste órgano. Con unas pinzas finas se toma una pequeña porción del HP y se observó al microscopio de luz.

- Se examinó el HP, para conocer la cantidad de vacuolas lipídicas en los túbulos hepatopancreáticos, conocer el estado y la forma de los túbulos hepatopancreáticos.
- Presionar el HP, se observó y anotó el color y textura.
 - a) blanco y acuoso = atrofia severa
 - b) negro y blando = necrosis hepatopancreática (NHP), o probable infección causada por *Vibrio* sp. o Aflatoxinas.
 - c) naranja a rojo = usualmente normal
- Intestino: El abdomen se separó del cefalotórax, telson y urópodos para facilitar la extracción del intestino. Por la parte posterior se localiza el intestino que puede o no contener hilo fecal, con una pinza fina se extrae y se coloca en un portaobjetos de la siguiente manera: uno de los extremos del intestino se detiene con una pinza y con el portaobjetos ligeramente inclinado se presiona el intestino y con las pinzas se jala para extraer el contenido que se analiza al microscopio para conocer que es lo que esta comiendo en ese momento, como por ejemplo, alimento balanceado, alimento artificial, Así como también conocer los parásitos internos como gregarinas, nemátodos entre otros.
- Músculo: Se tomó una pequeña muestra de músculo, especialmente que muestre opacidad de tipo lechoso, se coloca en un portaobjetos y se presiona para facilitar la búsqueda de microsporidios.

- Apéndices, pleopodos y pereiópodos. La presencia de bacterias filamentosas u otros epibiontes (por ejemplo: *Leucothrix mucor*, *Epistylis* y *Zoothamnium* spp.) puede detectarse, por lo general, con una mayor frecuencia en la superficie dorsal del caparazón y en la superficie de los apéndices.

8.2.1.4 Muestreo.

El muestreo fue en forma dirigida a camarones vivos, aparentemente infectados con la rickettsia NHP con atrofia hepatopancreática. A estos organismos se les realizó un estudio en fresco, el cual consistía en realizar un análisis de los hepatopáncreas para realizar el diagnóstico presuntivo. Una vez comprobado, los organismos fueron fijados en nitrógeno líquido, para posteriormente conservarlos en ultra congeladores a -70°C ., hasta realizar el análisis por PCR.

8.3. Método de diagnóstico histopatológico.

- Análisis Histopatológicos de Hematoxilina & Eosina.

Muchas de las enfermedades reconocidas que afectan a los camarones peneidos son diagnosticados por medio de análisis histológicos rutinarios. (Lightner *et al* 1983,1985).

- Método de fijación de tejido fresco.

Aunque las técnicas de fijación son simples, también son importantes, ya que se puede llegar hacer una mala interpretación de los resultados, por lo tanto los especímenes deben de ser fijados inmediatamente después de haber sido sacados del agua, tratando de evitar el estrés causado por el manejo. Los ejemplares se inyectaron

con solución Davidson AFA, que se prepara de la siguiente manera 330 ml. de alcohol etílico al 95%, 220 ml de formaldehído (solución saturada con gas formaldehído, concentración final de 37-39%), 115 ml de ácido acético glacial, y 335 ml de agua destilada) para después almacenarla a temperatura ambiente.

- Preparación para el embebido de los tejidos de camarón.

Se separa el cefalotórax del abdomen con la ayuda de un bisturí, haciendo un corte transversal y después se realizan los cortes longitudinal y transversalmente del cefalotórax y del abdomen por separados y los tejidos son colocados dentro de cajas de infiltrado, los cortes deberán de ser un grosor menor de ocho milímetros y colocados en moldes con parafina.

- Procesamiento de los tejidos (procesamiento automático).

Consiste en una serie de baños de alcoholes, aumentando gradualmente de 70% hasta llegar a 100%, para luego pasarlos a dos baños por una hora con Xileno para deshidratarlos totalmente, posteriormente se incluyen en bloques de parafina.

- Embebido en bloques de parafina.

Una vez que los tejidos han sido satisfactoriamente infiltrados, se colocan en los moldes de embebidos para formar los bloques.

Corte de los tejidos embebidos en bloques de parafina. Los cortes se llevan a cabo por un micrótopo, para realizar los cortes histológicos de los diferentes órganos del camarón

- Tinción de hematoxilina & eosina.

Típicamente las preparaciones histológicas requieren de una tinción estándar, la de hematoxilina & eosina de Harris son la de mayor aplicación (Luna; 1968; Bell y Lightner, 1998).

8.4 Método de hibridación *in situ*.

La hibridación *in situ* puede ser utilizada para detectar secuencias virales y geonómicas entre otras con pruebas específicas complementarias de DNA. El uso de etiquetadores no radioactivos tales como digoxigenina-11-dUPT (DIG) provee de un método de diagnóstico altamente específico para algún efecto sobre el tejido (los cuales pueden dar por resultado un diagnóstico positivo falso en los ensayos “dot blot” con muestras de tejido homogeneizado) que puede ser fácilmente distinguible de las lesiones histológicas específicas que reaccionen con el etiquetador. El siguiente protocolo utiliza el Sistema Genius desarrollado por Boehringer Mannheim Biochemicals (2000) y descrito en el Genius Nonradioactive *In Situ* Hybridization Manual (2001).

8.4.1. Preparación de la muestra.

El fijador de tejidos AFA Davidson ha sido utilizado exitosamente en el procedimiento de hibridación *in situ* descrito en esta sección. Los tejidos fijados con otros agentes tales como el gluteraldehído pueden ser utilizados en este mismo protocolo. En adición, esta técnica puede ser utilizada con tejidos congelados.

8.4.2. Procedimiento.

- Incrustar el tejido en parafina y cortar las secciones que serán de 4 μm o menos de espesor.

- Calentar los cortes histológicos en horno a 60°C durante 45 minutos.
- Rehidratar los tejidos de la siguiente manera:

Xileno o xileno substituto	3x	5 minutos cada uno
Alcohol absoluto	2x	1 minuto cada uno
Alcohol al 95%	2x	1 minuto cada uno
Alcohol al 80%	2x	1 minuto cada uno
Alcohol al 50%	1x	1 minuto
Agua destilada	6 enjuagues	(no dejar fuera las transparencias)
TNE 1x	1x	5 minutos

- Preparar proteinasa K fresca (PK) a 100 µg en TNE 1x. Colocar las transparencias limpias 1 ml de solución PK e incubar durante 15 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- Colocar las preparaciones en formaldehído al 0.4% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Lavarlas con SSC 2x durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Cubrir las secciones con 0.5 ml de buffer de hibridación e incubar en cámara húmeda durante un mínimo de 30 minutos a 37°C
- Hervir el etiquetador DIG, durante 10 minutos y enfriar inmediatamente con hielo, guardar en frío para prevenir que las trenzas de DNA se endurezcan.
- Para IHHNV, HPV y TSV diluir la prueba a 10-25 ng/ml de solución hibridadora y sumergir la sección de tejido con 0.25 ml de la solución

- Para BP, MBV, WSBV y NHP: se requiere de hervir la prueba, en este paso se desnaturaliza el dsDNA. Diluir la prueba a 10-25 ng/ml en solución hibridadora y sumergir la sección con 0.25 ml de solución
1. Incubar los cortes histológicos durante toda la noche en una cámara húmeda a 42° C (BP, MBV, WSBV, NHP y TSV).
 2. Lavar con búferes precalentados:

SSC 2x	2x	5 min Cada uno	37° C
SSC 1x	2x	5 min Cada uno	37° C
SSC 0.5x	2x	5 min Cada uno	37° C
SSC 0.1x	2x	5 min Cada uno	37° C
Buffer 1.1x	1x	5 min	Temperatura ambiente
 3. Preparar el buffer II y el buffer bloqueador mientras las transparencias son lavadas. Preparar 1 ml por transparencia. Poner la solución a enfriar a temperatura ambiente antes de usar. Con las preparaciones limpias, bloquear las secciones con 0.5 ml, por corte histológico con buffer II. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
 4. Con anticipación a su uso, diluir el anticuerpo fosfatasa alcalina anti-DIG (AP)-conjugada en buffer II: dependiendo de la prueba se utiliza la concentración, la dilución del anticuerpo debe ser de 1:1000 a 1:5000.
 5. Sumergir el tejido con 0.5 ml de diluido conjugado e incubar en cámara húmeda durante 30 a 45 minutos a 37°C (incubar sólo 30 minutos).
 6. Equilibrar en buffer III durante 5 min a temperatura ambiente
 7. Preparar la solución desarrolladora sólo antes de usarla. Añadir 0.5 ml e incubar en cámara húmeda, en la oscuridad, durante 2-3 horas a temperatura ambiente. Monitorear si se da la reacción positiva después de la primera hora de incubación;

utilizar objetivo de bajo aumento y observar las precipitaciones oscuras en los tejidos. Detener la reacción cuando el control aparezca óptimo.

8. Detener la reacción lavando con buffer IV durante 15 minutos a temperatura ambiente. Enjuagarlas con agua destilada

9. Contrateñir las secciones con Bismark Brown Y durante 1 minuto a temperatura ambiente.

10. Deshidratar los cortes histológicos de la siguiente manera:

Alcohol al 95%	3x	1 min cada una
Alcohol absoluto	3x	1 min cada una
Xileno o un sustituto	4x	1 min cada una

11. Montar en el medio (Permount)

12. Examinar las preparaciones al microscopio y observar que la deposición celular tenga un color azul oscuro al negro y/o para citopatología específica la cual debió etiquetarse para la prueba:

- IHHNV, en las células de origen ectodermal y mesodermal (ejemplo: branquias, tejido hematopoyético, cordón nervioso, etc.) observar para encontrar cuerpos de inclusión intranuclear Cowdry A (CAI's) los cuales son de color azul oscuro o negro, así como otros depósitos asociados con masas citoplasmáticas con virus o núcleos infectados que estén sin diagnóstico patológico CAIs.
- WSSV, en las células epiteliales cuticulares y en las células del tejido conectivo; buscar inclusiones de cuerpos los cuales deberán ser e color azul oscuro o negro así como otros depósitos etiquetados para la prueba que puedan encontrarse asociados con masas citoplasmáticas con virus o núcleos infectados con inclusión de cuerpos.

- NHP, en las células epiteliales hepatopancreáticas de los túbulos buscar la deposición que será de color azul oscuro o negro precipitado los cuales se encuentran asociados con organismos “rod-shaped” (forma de varilla) que a veces pueden aparecer difusos en las masas del organismo.
- TSV, durante la fase aguda de la enfermedad, en el epitelio cuticular de toda la superficie del cuerpo así como en los apéndices, branquias, esófago y estómago, buscar la deposición citoplasmática de color oscuro.
- El tejido puede ser fijado desde que el animal está moribundo (no muerto) y el fijador puede ser reemplazado con etanol al 70% después de 24 horas.
- La sección de tejido no debe prepararse un día antes del ensayo *in situ*, tampoco deben calentarse las transparencias, sólo justamente antes de realizar el ensayo de deshibridación.
- Si el tejido ha sido preparado en una fuente externa, la posibilidad de que exista una manipulación inadecuada del espécimen puede dar como resultado una respuesta negativa-falsa, sin embargo, la histología estándar H&E debe ser ejecutada en conjunción con este ensayo.

8.5. Método de diagnóstico de enfermedades por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

8.5.1. Extracción de Templado de DNA para PCR.

El DNA fue extraído de los hepatopancreas de *Litopenaeus vannamei* infectados con necrosis hepatopancreática, utilizando el estuche 'High Pure PCR Template Preparation Kit' (Roche Diagnostic), el cual consiste en colocar de 25 a 50 mg de tejido de hepatopancreas (previamente congelado a -70°C) en un microtubo de 1.5 ml (Eppendorf[®]) y se le agregó 200 μl de buffer de lisis (Urea 4M, Tris 200mM, NaCl 20mM, EDTA 200 Mm, pH 7.4 a 25°C) y 40 μl de proteinasa K. El tejido se homogeneizó con un macerado de pistilo y se incubó por 1 hora a 55°C , seguido de la adición de 200 μl de buffer de unión (Guanidina-HCL 6 M, Urea 10 Mm, tris-HCL 10 mM, Triton X-100 20%(v/v) pH 4.4 a 25°C).

Posteriormente se mezcló e incubó a 72°C durante 10 min., agregándosele 100 μl de isopropanol; el homogenizado se mezcló por inversión depositando el sobrenadante en un tubo filtro previamente ensamblado a su tubo colector, provisto en el estuche. Se centrifugó a 8000 rpm durante un 1 min, se descartó el filtrado y se colocó un nuevo tubo colector.

Se le agregaron 500 μl de buffer de lavado (NaCl 20 mM y Tris-HCl 2 Mm, pH 7.5 a 25°C) y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min, repitiéndose dos veces el mismo paso. Para remover el amortiguador de lavado residual se centrifugó a 13,000 rpm por 10 seg, se descartó el tubo colector y se colocó un tubo de reacción, eluyendolo con 200 μl de buffer de elusión (Tris 10 Mm, pH 8.5 a 25°C) precalentado a 72°C por

centrifugación (8000 rpm por 1 min). Finalmente se conservó en el tubo de reacción el DNA el cual puede ser usado de inmediato o conservado a 4° C hasta el momento de ser utilizado para el PCR.

8.5.2. Selección de iniciadores para la reacción.

Se utilizaron dos oligonucleotidos que reconocen regiones variables del gen 16S rDNA de la bacteria NHP y amplifican un producto de 209 bp. Los primers fueron sintetizados de acuerdo a las secuencias nucleotídicas citadas por Loy y Frelier (1996), confirmándose previamente los sitios de anillamiento de los primers en la región ribosomal 16S RNA de la rickettsia en el GenBank (acceso N°. UAU65509). La secuencia de primer delantero (f 27) es 5´ ACATGCAAGTCGAACGCAATAGG y la secuencia del primer reverso (r 235) es 5´ ACAGATCATAGGCTTGGTAGGCTG.

8.5.3. Control positivo

Se utilizó como control positivo el DNA de la NHP contenido en el estuche *ShrimPCaReTM* Múltiplex Primer Kit DiagXotics^R Inc. (2µl de control positivo para múltiplex WSSV-IHHNV-NHP-HPV, 1µl de primer mix, 3µl de MgCl₂, 19µl de Agua estéril) el cual contiene un set de primers que amplifican a 312 pb y que además contiene como control interno, una región del DNA de camarón que amplifica a 506 bp los cuales sirven como patrón en la reacción de amplificación.

6.5.4. Control negativo.

Consistió en agua desionizada, estéril, en presentación de ampollitas de 1 ml (IMSS).

8.5.5. Amplificación del DNA.

Las muestras de DNA usadas en el proceso de amplificación totalizaron 0.2- a 0.3 mg/ml, agregándose 1 µl de primer mix a la mezcla de reacción, la cual se llevo acabo utilizando el método Ready-to-Go™ RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) a un volumen final de 25µl, conteniendo 2.0 unidades de *Taq* DNA polimerasa, 10mM Tris-HCl, pH 9.0 a 25° C, 60 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, dNTP 200 µM de cada uno, al amplificación se efectuó en un termociclador Thermal block II, con el siguiente programa:

Precalentar 5 minutos a 95° C

1 ciclo	95° C por 2 minutos
40 ciclos	94° C por 30 segundos
	55° C por 30 segundos
	72° C por 90 segundos
1 ciclo	72° C por 7 minutos

8.5.6. Electroforesis en gel de Agarosa.

Los productos del PCR fueron evaluados mediante electrofóresis en gel de agarosa al 1% (1 gramo de agarosa por 100 ml de buffer) se adicionó bromuro de etidio (1 mg/ml), buffer de corrida TBE 0.5 X., se utilizo DNA Ladder 100 (Invitrogen) como marcador de pares de bases. El tiempo de corrida fue de 30 min. a 100 V para adquirir la resolución necesaria, una vez llevado acabo el proceso de electroforesis el gel fue removido y colocado sobre un transiluminador de luz UV, usando lentes protectores se procedió a registrar los productos amplificados en una cámara Polaroid para interpretar los resultados.

8.6. Método de microscopía electrónica de transmisión (MET).

8.6.1 Aislamiento de la bacteria NHP.

Se depositaron 10 hepatopancreas conservados en nitrógeno líquido en 5 ml de 1.6 % NaCl para macerarlos con un homogeneizador de tejidos. El homogeneizado fue centrifugado a 2000 rpm/10 min en un rotor IEC 878. El supernadante fue recuperado para el aislamiento de la bacteria. Para el proceso de purificación se utilizó la técnica de centrifugación en gradiente de densidades en percoll (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), bandeando el sobrenadante sobre el gradiente de percoll a una concentración final del 38.8 % (33.8ml de percoll, 10.0 ml de 1.5 M NaCl, 56.2 ml de agua estéril) centrifugando a 3250 rpm/2 h a 4° C., recuperándose las bandas blanquecinas, según las modificaciones recomendadas por Frelier *et al.* (1993). Las bandas fueron centrifugadas nuevamente a 3250 rpm/20 min. a 4° C y 13,300 rpm/15 min. a 4 ° C (rotor IEC 875) en NaCl 1.6 %, recuperando los precipitados y conservándolos en alícuotas a -70 ° C . De cada alícuota, se realizaron frotis para teñirlos con el colorante de Gram (Loy et al., 1996), PCR y Microscopía Electrónica de Transmisión.

8.6.2. Tinción negativa (MET)

La metodología empleada para la observación de partículas bacterianas en el MET es el siguiente, fijar una alícuota de los purificados bacterianos en glutaraldehído al 6% y posteriormente se depositaron en parafilm ®; sobre esta se colocó una rejilla de cobre cubiertas con collodion y teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico (PTA) 2 % a pH 7 para examinarlo al MET (Allain y Berthiaume, 1993). Los purificados

bacterianos se examinaron y se fotografiaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss Em-190 para su interpretación.

Las medidas de las formas bacterianas se obtuvieron con la ayuda de un lente de aumento (10X) con escala graduada en décimas de milímetros y se transforman en dimensiones reales con la siguiente formula:

$$T_f = T_r \times A_f$$

Donde: Tf = Tamaño de la foto, Tr = Tamaño real del virus y Af = Aumento de la foto.

$$T_r = \frac{T_f \times (\text{mm} 10^6)}{A_f}$$

Considerando que: 1 mm = 10⁶ nm

8.7 Purificación de DNA específico de la bacteria NHP.

A partir de los amplificados de PCR obtenidos de los hepatopáncreas positivos a NHP se realizó la purificación del producto total con el Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega©), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para el producto de PCR electroforado en gel de agarosa, se colocaron 10 µl de solución enlace de membrana (MBS) por cada 10 mg de gel para incubarlos a 60° por 10 min. Para el producto de PCR en el tubo de reacción (liquido) se le agregó un volumen igual de solución de membrana, al volumen total de la mezcla del mismo. Después utilizando una mini-columna se incubó por 1 min a temperatura ambiente para ser centrifugado a 16,000 rpm por 1 min. El sobrenadante fue lavado dos veces con solución de lavado de membrana (MWS); primero con 700 µl y centrifugado a 16,000 rpm por 1 min, y después con 500 µl centrifugado por 5 min a 16,000 rpm. Finalmente, al producto de

interés se le agregaron 50 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó por 1 min a 16,000 rpm para recolectar aproximadamente de 42 a 47 µl de DNA purificado, que fue conservado de -4 a -20 °C, para posteriormente ser clonado.

8.7.1 Clonación de los productos purificados de PCR.

Se utilizó el pGEM-T Easy Vector System (Estuche de Promega Corp.©) siguiendo las especificaciones del fabricante. En cada reacción se añadió 5 µl del buffer 2X rápida ligación, T4 DNA ligasa, 1 µl del vector pGEM-T Easy, de 2 a 4 µl de producto de PCR, 1 µl de T4 DNA ligasa y se aforo a 10µl con agua desionizada para dejar incubándose toda la noche a 37 °C.

Para la reacción de transformación se añadió 950 µl de medio SOC y 50 µl de células JM109 competentes, altamente eficientes para recibir un shock térmico de 50 seg a 42 °C; 100 µl de esta mezcla se colocó sobre placas con medio Luria Bertani (LB, Gibco©) con ampicilina para ser incubadas de 16 a 24 h a 37 °C.

Las colonias que crecieron fueron sembradas en caldo LB (con ampicilina) para recuperar el DNA con el método de lisis por calentamiento, (Sambrock & Rusell, 2001) al cual posteriormente se le realizó un PCR seguido de electroforesis para confirmar la presencia del inserto específico de NHP clonado.

8.7.2. Purificación de los plásmidos (Minipreps).

Producción del lizado claro. 5 µl del cultivo de bacterias, se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm; al sedimento recuperado, se le añadió 250 µl de la solución de resuspensión de células mezclando con vortex, posteriormente se le añadió 250 µl de

solución de lisis celular mezclando por inversión hasta obtener una suspensión de color claro, al cual se le agregó 10 µl de proteasa alcalina y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, después se le agregó 350 µl de Wizard Plus SV, neutralización mezclando por inversión para centrifugar por 10 min a 14,000 rpm.

El lizado claro obtenido, se transfirió a una minicolumna y se centrifugó por 1 min a temperatura ambiente; posteriormente a la columna se le añadió 750 µl de solución de lavado y se centrifugó por 1 min a temperatura ambiente; se repitió este paso, con 250 µl de la solución de lavado y centrifugando por 2 min. El producto de interés fue colectado agregando 50 µl de agua libre de nucleasas centrifugando por 1 min siendo almacenado a -20 °C. Los resultados de la purificación fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

8.7.3 Secuenciación genómica de productos clonados.

El DNA a secuenciar fue conservado en agua ultrapura (20 µl) a una concentración de 250-400 ng/µl, los primers también se enviaron por separado en agua a una concentración de 20 picomoles por microlitro (20 µl aproximadamente de cada uno). La secuenciación se realizó con un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser de Perkin-Elmer, por electroforesis capilar en el Laboratorio de Fisiología Celular de la UNAM. Cabe mencionar que solo dos muestras representativas fueron secuenciadas, la muestra 21 perteneciente a la granja Acuícola Lobos que se ubica al norte de la zona muestreada, y la muestra 622 perteneciente a la granja Acción Acuícola que se encuentra en la zona sur.

8.7.4. Análisis de las secuencias genómicas.

Usando FASTA y BLAST las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias homólogas reportadas en el GenBank/ENBL. Así mismo, las secuencias fueron alineadas usando CLUSTAL 1.82 (Thompson *et al*, 1997).

8.8. Parámetros fisicoquímicos.

Los parámetros mas importantes que fueron registrados en las granjas de camarón estudiadas son, Temperatura y oxígeno, fue tomado dos veces al día (6:00 y 14:00 hrs.), utilizando equipo portátil (Oxímetro YSI- mod.58), La concentración de sal fue tomada una sola vez al día utilizando un refractómetro portátil (Aquatic eco-system, Inc.), además, se muestrearon semanalmente los siguientes parámetros fisicoquímicos; nitratos, nitritos nitrógeno amoniacal, pH. Utilizando el equipo de laboratorio Hach DR-2000.

9 RESULTADOS

9.1. Análisis en fresco.

La identificación preliminar de la NHP se realizó en camarones con hepatopáncreas atrofiado, túbulos hepatopacréaticos con disminución o ausencia de vacuolas lipídicas, estrangulamiento o necrosis de los túbulos hepatopancreáticos y tiempo de coagulación normal, de acuerdo a Lightner, (1996). Se analizaron 648 muestras para análisis en fresco de las cuales un total de 330 resultaron positivas por este método de análisis en fresco (Tabla IV).

Tabla IV

Relación de granjas estudiadas, así como la cantidad de organismos seleccionados por cada técnica de diagnóstico diferente. Necrosis hepatopancreática (NHP), Hematoxilina & Eosina (H&E), Hibridación *in situ* (ISH), Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Granja	No. de organismos	Análisis en fresco	Positivos NHP	H&E	ISH	PCR	MET
A. Acuícola	184	184	27	12	5	5	5
Desheredados	14	14	4	1	1	1	1
Gygyso	39	39	19	4	5	5	5
A. Lobos	277	277	165	16	16	16	16
La L. de Felix	105	105	90	9	9	9	9
L. Acuícola	29	29	25	10	5	5	5
Total	648	648	330	52	41	41	41

Esta técnica presuntiva se puede realizar en laboratorio o en campo. Consiste en la disección del camarón donde se observaron las alteraciones que presentaban tanto órganos como tejidos que en este caso fueron: pleopodos de coloración café, flacidez muscular, branquias ennegrecidas, expansión de cromatóforos, atrofia del

hepatopancreas y reducción del crecimiento, obteniéndose resultados presuntamente positivos para la necrosis hepatopancreática (NHP) en todas las muestras analizadas (Fig. 5-6). En las Figs. 7-8 podemos observar como se preparan las laminillas en fresco para su posterior análisis al microscopio de luz, en las Figs. 9-12, es el resultado de los análisis en húmedo referente a los grados de severidad de los túbulos hepatopancreáticos, donde podemos observar el grado 0 donde encontramos túbulos hepatopancreáticos normales, túbulos grado 1, con algunas deformidades, grado 3 con algunas estrangulaciones en los túbulos y en el grado 3-4 encontramos con los túbulos hepatopancreáticos con necrosis severa. En las Figs. 13-16 encontramos los diferentes grados de severidad referentes a la cantidad de vacuolas lipídicas, que indica que los organismos están bien alimentados (grado 1), se observa una cantidad del 75% llenos los túbulos, en los túbulos hepatopancreáticos en el grado 0 , se presentan túbulos normales con un grado 2; con un 50% y en el grados 3-4 una marcada ausencia de vacuolas lipídicas en los túbulos hepatopancreáticos, lo cual indica que estos organismos por algún motivo no se están alimentando bien.

9.2. Histopatología. (Hematoxilina & Eosina)

El hepatopáncreas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, mostró túbulos con células hepatopancreáticas basófilas e hipertrofiadas conteniendo organismos NHP (Fig. 21) en un grado de severidad de 3-4. El examen histopatológico también reveló histopatológico marcada necrosis en los túbulos hepatopancreáticos, cambios en las células hepatopancreáticas y una dilatación tubular debido a una fuerte infección de bacterias NHP con grado de severidad 3-4 (Fig. 22).

9.3. Hibridación *in situ*.

La presencia de la bacteria NHP se confirmó por la prueba de hibridación *in situ*, con una sonda genética específica para NHP, las masas intracitoplasmática de bacterias se tiñeron de color azul o azul-negro al reaccionar con la sonda. Las células normales, así como los núcleos, se tiñen de amarillo con el café Bismark, el grado de severidad observado en los organismos NHP positivos oscilo entre el 3 y 4 (Figs. 23 y 24).

9.4. Análisis de PCR.

Se realizaron 41 análisis de PCR en las seis granjas muestreadas, las cuales resultaron positivas para todas ella, como lo muestra la Fig. 25 del gel de agarosa al 1%. En muestras de las granjas, Acción Acuícola, Desheredados, Gygyso. Lobos y La Loma de Félix, respectivamente fue amplificado el fragmento de 209 pares de bases,

9.5. Análisis de Microscopia Electrónica.

Los resultados obtenidos al MET de los bandeos en percoll, con tinción negativa, muestra las dos formas de la bacteria NHP, en forma de bacilo (Figs. 26 y 27), que es donde mas similitud tenemos con las medidas realizadas en nuestro laboratorio y en la forma de hélice, siendo mayores en longitud. En la Tabla V se observa las medidas morfológicas de la bacteria por diferentes autores.

Tabla V

Comparación de las medidas morfológicas de la bacteria NHP, analizadas por microscopía electrónica de transmisión.

Autor	Forma	Medidas (μm)
Lightner (1996)	Bacilo Hélice	0.25 x 0.90 0.25 x 2.0 – 3.5
Krol et al (1991)	Bacilo Hélice	0.30 x 0.90 0.26 x 2.0 – 3.0
Laboratorio de la UANL-ITSON (2004)	Bacilo Hélice	0.20 x 0.60 0.23 x 1.32

9.6. Purificación de DNA específico de la bacteria NHP.

El resultado de una electroforesis después de la purificación del DNA específico de cuatro muestras de NHP con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up, demuestra claramente la ausencia de las bandas inespecíficas que interferían con el proceso de clonación (Fig. 28)

El proceso de clonación con el pGEM-T Easy Vector resultó como se esperaba, ya que el segmento insertado de 209 pb específico de la NHP continuó estando presente después de las dos reacciones acontecidas (ligación y transformación); esto se verificó nuevamente con la amplificación del segmento específico de 209 pb específico de la NHP por PCR (Fig. 29).

Algunos de los productos de clonación purificados (plásmidos) enviados a secuenciar, (Fig. 30). fueron descartados por la presencia de contaminantes como carbohidratos o proteínas que afectaron la reacción y/o la electroforesis. Así mismo, en

la misma figura se observa que los plásmidos que más migraron, son los que se encuentran en forma súper-enrollada, y los que migraron menos corresponden a su forma lineal.

La secuencia de 209 pb que pertenece a regiones variables del gen 16S rDNA de la bacteria NHP-B reportada en Texas y Perú y que se encuentra reportada en el GenBank con el número **U65509** y es la siguiente:

acat gcaagtcgaa cgcaataggt tcgcctattg agtggcagac gggtagtaa tacacgggaa tctacctta
ggtaaggaat agctacggga aactgtaggt aataccttat aatatgtgca aacatcaaag atttatcgcc tagagaggag
cccgtgccag attaggtcgt tggtagggta acagcctacc aagcctatga tctgt . (La posición de los primers está subrayada).

La búsqueda en bancos de datos con el programa BLAST, reveló la presencia de la secuencia del fragmento de 209 pb (NHP) perteneciente a la α -proteobacteria reportada en Texas y Perú. Posteriormente estas secuencias se alinearon y se compararon utilizando el programa CLUSTALW.

Los resultados de la homología con la búsqueda Blast de las dos muestras representativas secuenciadas, es la siguiente:

La muestra 21 proveniente de la granja Acuícola Lobos, presentó hasta un 99 % de homología con el rDNA de la α -proteobacteria reportada en el GenBank (UAU65509), donde el único nucleótido diferente fue el número 122, con la sustitución de G \rightarrow A, los detalles se muestran en la Fig. 31.

La muestra 622, de camarones cultivados en la granja Acción Acuícola, mostró el 100 % de homología con la secuencia reportada en el GenBank (UAU65509) perteneciente a la NHP reportada en Texas y Perú, como se muestra en la Fig. 32.

Los resultados obtenidos de la alineación múltiple con el programa CLUSTALW 1.82 (Thompson *et al*, 1997), confirmó los resultados obtenidos con el análisis BLAST; ya que en la alineación de la muestra 21, se observó nuevamente la sustitución de G por A (Fig. 33), y en la alineación de la muestra 622 no se mostró diferencia alguna. Fig. 34.

La secuencia del rDNA fue registrado en el banco de genes del EMBL (European Molecular Biology Laboratory) EBI (European Bioinformatic Institute) con el número de acceso AM411031.

9.7. Prevalencia y Parámetros fisicoquímicos.

En lo que se refiere al porcentaje de prevalencia, la mayor se presentó en la granja Lombardo Acuícola con un 86.2%, y salinidades y temperaturas mas altas en los meses de Junio y Julio; la granja con menor porcentaje de prevalencia fue Acción Acuícola con un 14.6% en los meses de Julio y Agosto. Tabla VI.

Tabla VI

Porcentaje de prevalencia de NHP en granjas de camarón del Sur del estado de Sonora de mayo a octubre del 2004.

Granja	% de prevalencia	Meses	Temperatura promedio (°C)	Salinidad Promedio (g/l)
A. Acuícola	(27/184) 14.6	Julio a Agosto	32	44.5
Desheredados	(4/14) 28.5	Septiembre, Octubre	28	42.0
Gygyso	(19/39) 48.7	Junio y Julio	31	45.5
A. Lobos	(165/277) 59.5	Agosto a Octubre	31	44.0
La L. de Felix	(90/105) 85.7	Junio a Septiembre	32	45.0
L. Acuícola	(25/29) 86.2	Junio y Julio	31	45.5



Fig. 5.- Camarón *L. vannamei* con signos macroscópicos de NHP donde se observan los pleopodos con una apariencia de melanización.



Fig. 6- Camarón *L. vannamei* donde se se muestra una marcada atrofia del hepatopancreas, el cual se encuentra reducido a un 50% de lo normal.

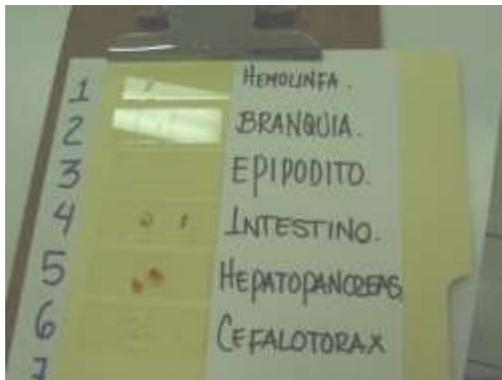


Fig. 7.- Preparación en húmedo de los diferentes órganos del camarón *L. vannamei* para su observación en el microscopio de luz.



Fig. 8.- Preparación en húmedo del hepatopancreas de un camarón con NHP, donde se observan túbulos hepatopancreáticos con necrosis.



Fig. 9.- Preparación en húmedo del hepatopáncreas donde se observan los túbulos hepatopancreáticos normales. Grado 0.

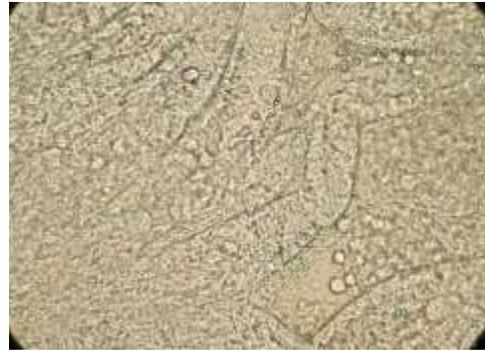


Fig. 10.- Preparación en húmedo del hepatopáncreas con los túbulos hepatopancreáticos con algunas deformidades. Grado 1.

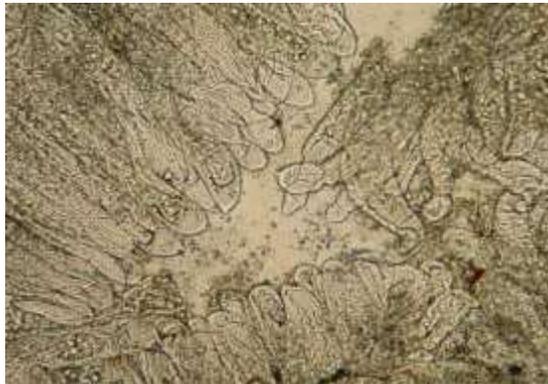


Fig. 11.- Preparación en húmedo del hepatopáncreas con los túbulos hepatopancreáticos con una ligera estrangulación. Grado 2.



Fig. 12.- Preparación en húmedo del hepatopáncreas que muestra túbulos hepatopancreáticos con necrosis severa. Grado 3.



Fig. 13.- Preparación en húmedo del hepatopancreas con una cantidad de vacuolas lipídicas abundantes. Grado 0.



Fig. 14.- Túbulos hepatopancreáticos con una cantidad de vacuolas lipídicas del 75%. Grado 1. Preparación en húmedo.



Fig. 15.- Túbulos hepatopancreáticos con vacuolas lipídicas al 50%, grado 2. Preparación en húmedo.

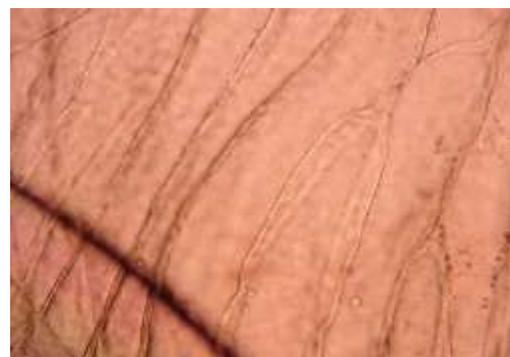


Fig. 16.- Túbulos hepatopancreáticos con ausencia de vacuolas lipídicas. Grado 3. Preparación en húmedo.

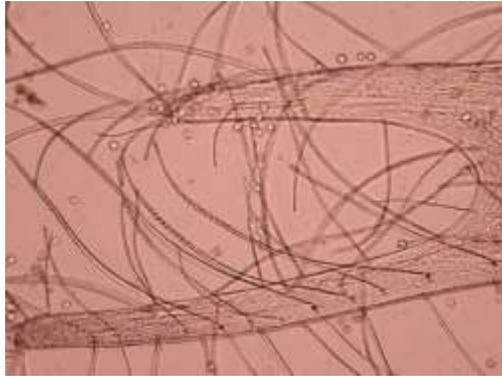


Fig. 17.- Epipodito de camarón donde se muestra la ausencia de parásitos epicomensales. Grado 0.

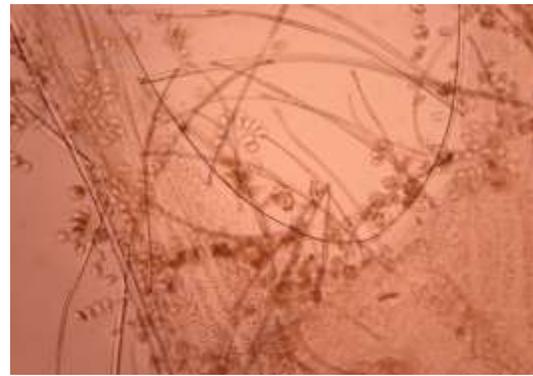


Fig. 18. Epipodito de camarón con infestacion del 50% por parásitos epicomensales. Grado 1.



Fig. 19.- Epipodito de camarón que muestra una infestacion del 75% por parásitos epicomensales. Grado 2.



Fig. 20.- Epipodito de camarón con una infestacion del 100% por parásitos epicomensales. Grado 3.



Fig. 21.- Tubulo hepatopancreático de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, donde se muestran colonias de NHP en células epiteliales. Tinción H&E, 600X.

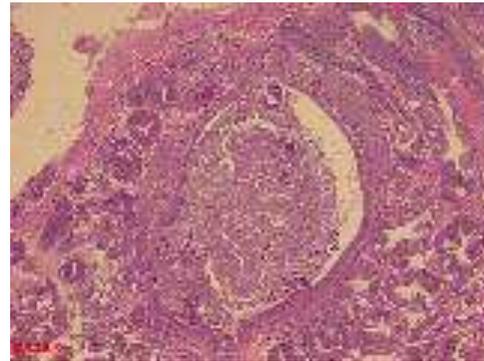


Fig. 22.- Corte histopatológico de hepatopancreas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, con una marcada necrosis en los túbulos hepatopancreáticos, cambios en las células hepatopancreáticas. Tinción H&E. Aumento 100X.



Fig. 23.- Microfotografía de hepatopancreas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, demostrando la presencia de la bacteria NHP, se realizó una prueba de hibridación *in situ*, las masas intracitoplasmática de bacterias se tiñen de color azul o azul-negro al reaccionar con la sonda. Aumento, 400X.



Fig. 24.- Magnificación de la microfotografía de hepatopancreas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, demostrando la presencia de la bacteria NHP, Tinción Bismarck Brown y sonda genética marcada con DGI. Aumento, 600X.

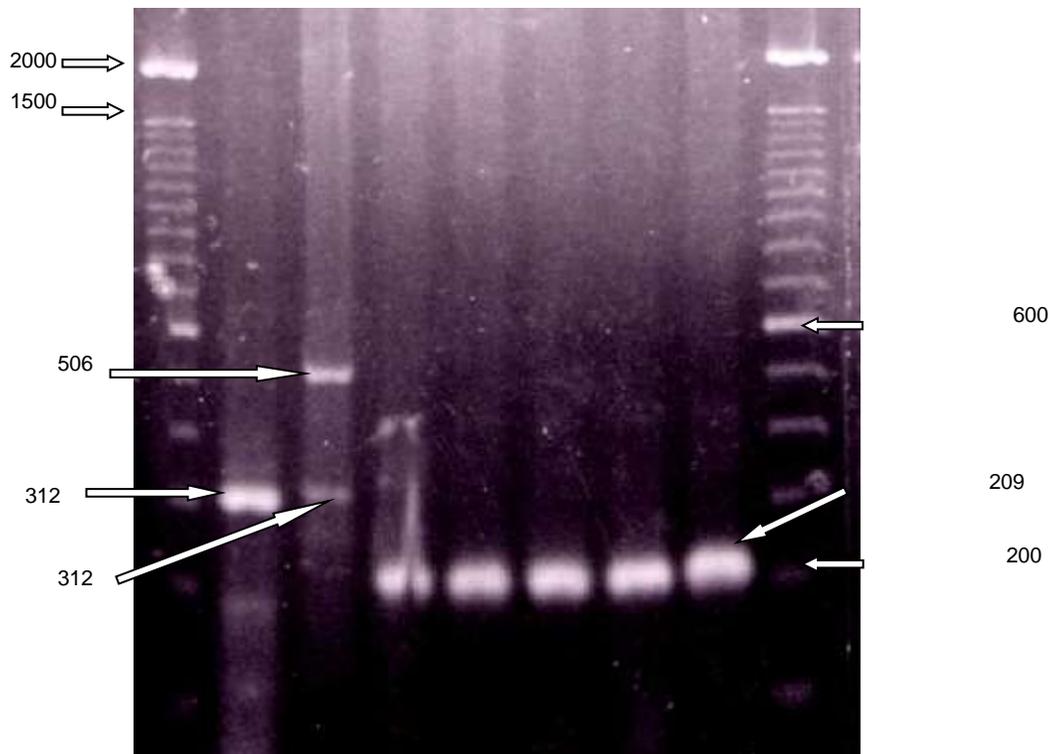


Fig. 25.- Resultados de las reacciones de PCR de muestras positivas a NHP. Carril 1: marcador de bp Lader 100, carril 2: control positivo de DiagXotics^R Inc. que amplifica a 312 bp, carril 3: PCR múltiplex amplificando a 506 bp para tejido de un camarón sano y a 312 bp para el DNA de NHP, carril 4, 5, 6, 7,8: muestras positivas de las granjas camaronicolas seleccionadas. A. Acuícola, Desheredados, Gygyso. A. Lobos. La Loma de Félix, respectivamente, amplificando a 209 bp con los primers citados por Loy y Frelier (1996), carril 9: marcador de bp Ladder 100. Gel de agarosa al 1%,

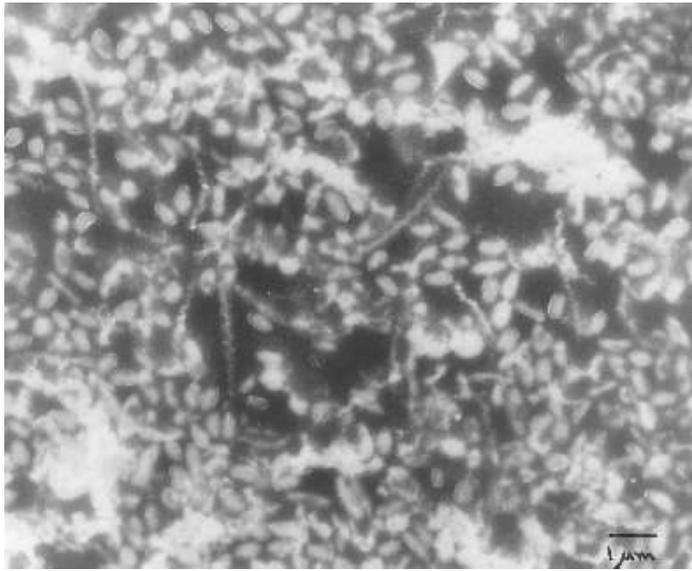


Fig. 26.- Micrografía electrónica de transmisión (MET) tomada bajo tinción negativa en purificados bacterianos NHP en el cual muestra las distintas formas de esta bacteria.

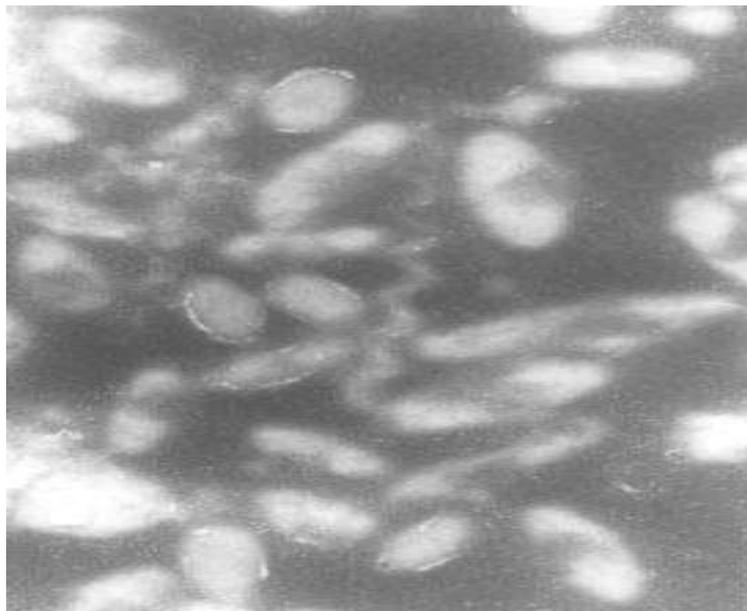


Fig. 27.- Aumento en la micrografía electrónica de transmisión (MET) tomada bajo tinción negativa en purificados bacterianos NHP donde muestra las dos formas de esta bacteria, (Bacilo y Hélice).

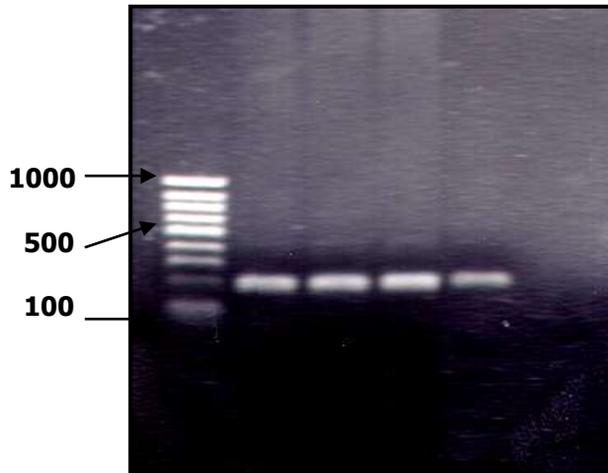


Fig. 28.- Amplicones de 209 pb de NHP completamente purificado. Carril M) Marcador molecular de 100 pb, 1) Acuícola Lobos, 2) Loma de Félix 3) Desheredados, 4) Acción Acuícola. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.



Fig. 29.- Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio que muestra los insertos de clonación de 209 pb amplificados por PCR y específicos para NHP. Carril M) marcador molecular de 1000 pb, 3), Acuícola Lobos, 4), Acción Acuícola.



Fig. 30.- Electroforesis que muestra los productos de clonación purificados. Plásmidos listos para su secuenciación: carril 2, Acuícola lobos, 8, Acción Acuícola; plásmidos eliminados para ser secuenciados, carril: 4, Acuícola lobos 6, Acción acuícola. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

```

>gi|1737125|gb|U65509.1|UAU65509 Unidentified alpha proteobacterium 16S ribosomal RNA
gene, partial
sequence
Length=1415
Score = 408 bits (206), Expect = 4e-112
Identities = 209/210 (99%), Gaps = 0/210 (0%)
Strand=Plus/Plus

NHP-B 73 ACATGCAAGTCGAACGCAATAGGTTTCGCCTATGAGTGGCAGACGGGTGGGTAATACACG 132
      |||
Sbjct 27 ACATGCAAGTCGAACGCAATAGGTTTCGCCTATGAGTGGCAGACGGGTGAGTAATACACG 86
NHP-B 133 GGAATCTACCTCTAGGTAAGGAATAGCTACGGGAAACTGTAGGTAATACCTTATAATATG 192
      |||
Sbjct 87 GGAATCTACCTCTAGGTAAGGAATAGCTACGGGAAACTGTAGGTAATACCTTATAATATG 146
NHP-B 193 TGCAAACATCAAAGATTATCGCCTAGAGAGGAGCCCGTGCCAGATTAGGTCGTTGGTGG 252
      |||
Sbjct 147 TGCAAACATCAAAGATTATCGCCTAGAGAGGAGCCCGTGCCAGATTAGGTCGTTGGTGG 206
NHP-B 253 GGTAACAGCCTACCAAGCCTATGATCTGTA 282
      |||
Sbjct 207 GGTAACAGCCTACCAAGCCTATGATCTGTA 236

```

Fig. 31.- Resultados de la comparación Blast entre la muestra 21 y la NHP reportada en el banco de genes.

```

>gi|1737125|gb|U65509.1|UAU65509 Unidentified alpha proteobacterium 16S ribosomal
RNA gene, partial
sequence
Length=1415
Score = 416 bits (210), Expect = 2e-114
Identities = 210/210 (100%), Gaps = 0/210 (0%)
Strand=Plus/Minus

NHP-B 70 TACAGATCATAGGCTTGGTAGGCTGTTACCCACCAACGACCTAATCTGGCAGGGCTCC 129
      |||
Sbjct 236 TACAGATCATAGGCTTGGTAGGCTGTTACCCACCAACGACCTAATCTGGCAGGGCTCC 177
NHP-B 130 TCTCTAGGCGATAAATCTTTGATGTTTGCACATATTATAAGGTATTACCTACAGTTTCCC 189
      |||
Sbjct 176 TCTCTAGGCGATAAATCTTTGATGTTTGCACATATTATAAGGTATTACCTACAGTTTCCC 117
NHP-B 190 GTAGCTATTCCTTACCTAGAGGTAGATTCCCGTGTATTACTCACCCGCTCGCCACTCAAT 249
      |||
Sbjct 116 GTAGCTATTCCTTACCTAGAGGTAGATTCCCGTGTATTACTCACCCGCTCGCCACTCAAT 57
NHP-B 250 AGGCGAACCTATTGCGTTCGACTTGCATGT 279
      |||
Sbjct 56 AGGCGAACCTATTGCGTTCGACTTGCATGT 27

```

Fig. 32.- Resultados de la comparación Blast entre la muestra 622 y la NHP reportada en el banco de genes.

```

*           20           *           40           *
NHP21      : ACATGCAAGTCGAACGCAATAGGTTTCGCCTATTGAGTGGCAGACGGGTGG : 50
UNIDENTALF : ACATGCAAGTCGAACGCAATAGGTTTCGCCTATTGAGTGGCAGACGGGTGA : 50
            ACATGCAAGTCGAACGCAATAGGTTTCGCCTATTGAGTGGCAGACGGGTG

           60           *           80           *           100
NHP21      : GTAATACACGGGAATCTACCTCTAGGTAAGGAATAGCTACGGGAAACTGT : 100
UNIDENTALF : GTAATACACGGGAATCTACCTCTAGGTAAGGAATAGCTACGGGAAACTGT : 100
            GTAATACACGGGAATCTACCTCTAGGTAAGGAATAGCTACGGGAAACTGT

           *           120           *           140           *
NHP21      : AGGTAATACCTTATAATATGTGCAAACATCAAAGATTTATCGCCTAGAGA : 150
UNIDENTALF : AGGTAATACCTTATAATATGTGCAAACATCAAAGATTTATCGCCTAGAGA : 150
            AGGTAATACCTTATAATATGTGCAAACATCAAAGATTTATCGCCTAGAGA

           160           *           180           *           200
NHP21      : GGAGCCCGTGCCAGATTAGGTCGTTGGTGGGGTAACAGCCTACCAAGCCT : 200
UNIDENTALF : GGAGCCCGTGCCAGATTAGGTCGTTGGTGGGGTAACAGCCTACCAAGCCT : 200
            GGAGCCCGTGCCAGATTAGGTCGTTGGTGGGGTAACAGCCTACCAAGCCT

           *
NHP21      : ATGATCTGTA : 210
UNIDENTALF : ATGATCTGTA : 210
            ATGATCTGTA

```

Fig. 33.- Resultados de la alineación CLUSTALW entre la muestra 21 y la NHP reportada en el banco de genes, donde se observa la sustitución de la G por la A.

```

*           20           *           40           *
NHP622 SP6 : TACAGATCATAGGCTTGGTAGGCTGTTACCCACCAACGACCTAATCTGG : 50
UAUUnident : TACAGATCATAGGCTTGGTAGGCTGTTACCCACCAACGACCTAATCTGG : 50
            TACAGATCATAGGCTTGGTAGGCTGTTACCCACCAACGACCTAATCTGG

           60           *           80           *           100
NHP622 SP6 : CACGGGCTCCTCTCTAGGCGATAAATCTTTGATGTTTGCACATATTATAA : 100
UAUUnident : CACGGGCTCCTCTCTAGGCGATAAATCTTTGATGTTTGCACATATTATAA : 100
            CACGGGCTCCTCTCTAGGCGATAAATCTTTGATGTTTGCACATATTATAA

           *           120           *           140           *
NHP622 SP6 : GGTATTACCTACAGTTTCCCGTAGCTATTCCTTACCTAGAGGTAGATTCC : 150
UAUUnident : GGTATTACCTACAGTTTCCCGTAGCTATTCCTTACCTAGAGGTAGATTCC : 150
            GGTATTACCTACAGTTTCCCGTAGCTATTCCTTACCTAGAGGTAGATTCC

           160           *           180           *           200
NHP622 SP6 : CGTGTATTACTCACCCGTCTGCCACTCAATAGGCGAACCTATTGCGTTTCG : 200
UAUUnident : CGTGTATTACTCACCCGTCTGCCACTCAATAGGCGAACCTATTGCGTTTCG : 200
            CGTGTATTACTCACCCGTCTGCCACTCAATAGGCGAACCTATTGCGTTTCG

           *
NHP622 SP6 : ACTTGCATGT : 210
UAUUnident : ACTTGCATGT : 210
            ACTTGCATGT

```

Fig. 34.- Resultados de la alineación CLUSTALW entre la muestra 622 y la NHP reportada en el banco de genes.

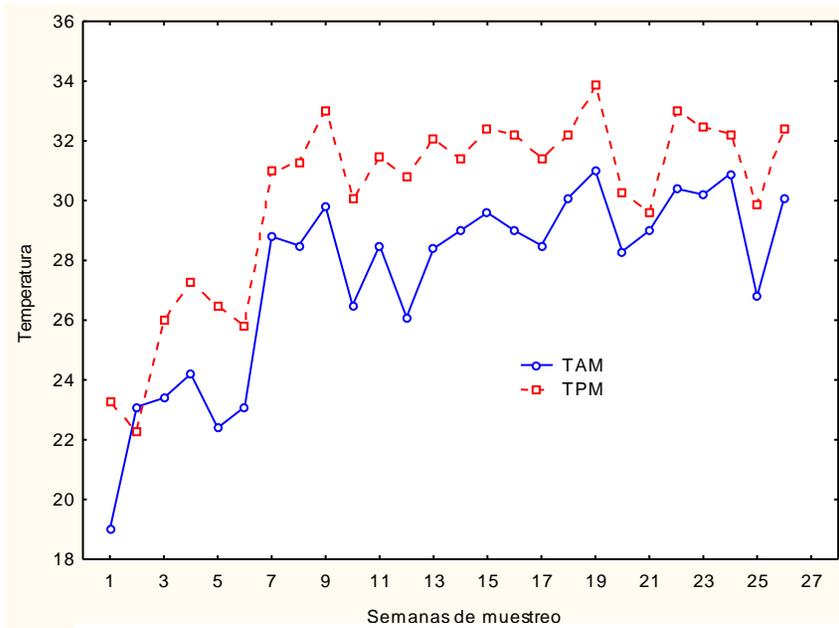


Fig. 35.- Gráfica de la temperatura (T) promedio matutina (AM-6:00 hrs) y vespertina (PM-18:00 hrs) semanal de La granja Acuícola Lobos 2004.

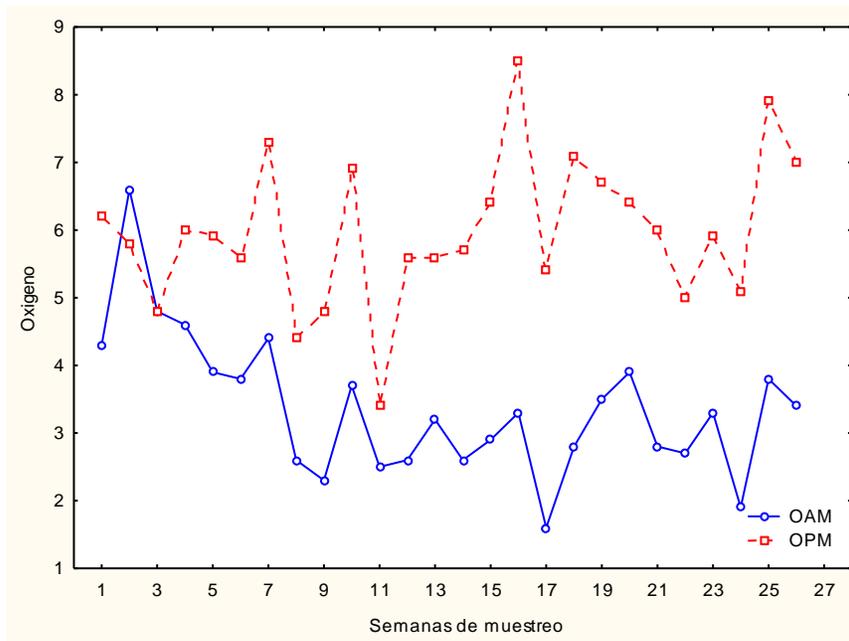


Fig. 36.- Gráfica de la oxígeno promedio (O₂) matutino (AM-6:00 hrs) y vespertino (PM-18:00 hrs) semanal de La granja Acuícola Lobos 2004.

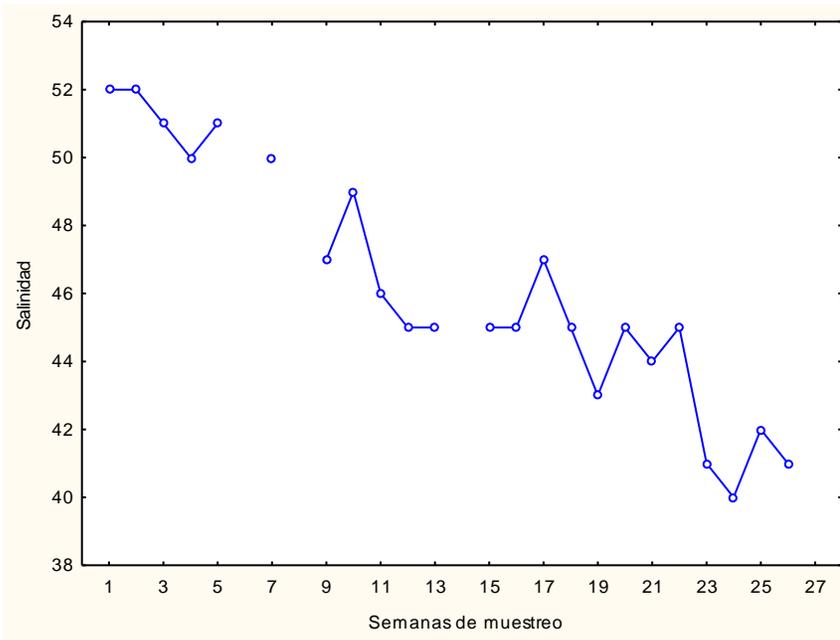


Fig. 37.- Gráfica de la salinidad promedio (12:00 hrs) semanal de La granja Acuícola Lobos 2004.

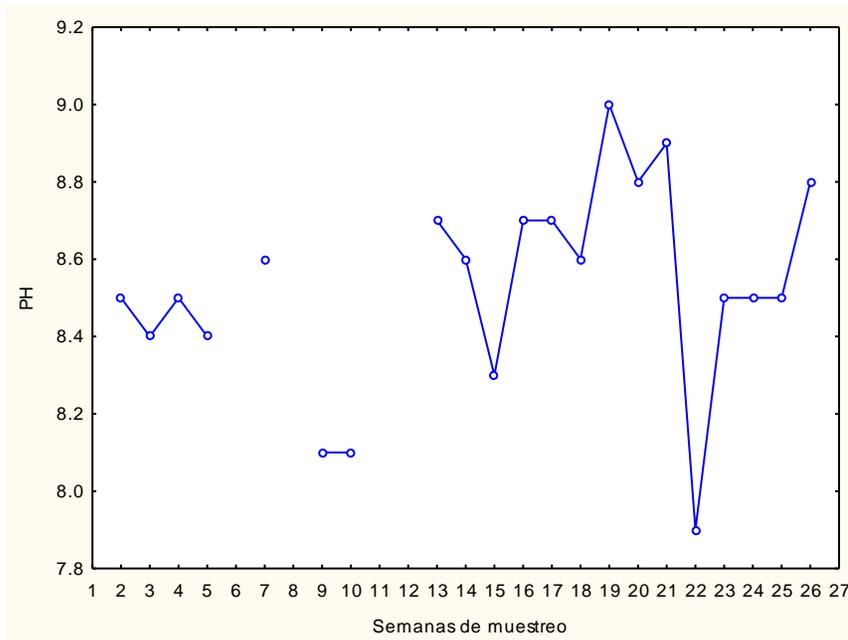


Fig. 38.- Gráfica del pH promedio (12:00 hrs) semanal de La granja Acuícola Lobos 2004.

10 DISCUSION

El diagnostico presuntivo de las principales enfermedades de camarón, significan un verdadero auxiliar en la detección anticipada de una enfermedad, además que son técnicas rápidas, efectivas y económicas ya que requieren de un mínimo material y pueden apoyar en la identificación de enfermedades como WSSV, TSV, IHHNV, NHP, vibriosis, micosis, epibiontes y protozoarios como gregarinas y microsporidios.

Las infecciones causadas por organismos rickettsiales o similares, en camarones silvestres o cultivados *P marginatus* y *P merguensis*, han sido descritas desde 1985 en Singapur y Malasia (Brock *et al.*, 1986), así como infecciones experimentales en *L stylirostris* (Lightner *et al.*, 1985), pero las patologías severas o epizootias asociadas específicamente a la bacteria similar a las rickettsias NHP, se encuentran documentadas en Estados Unidos de América, Centro y Sudamérica desde 1985 hasta años recientes (Jonhson, 1990; Lightner, 1996; Briñez *et al.*, 2003; Loy y Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996), con excepción de las granjas camaronicolas localizadas en México, donde solo se menciona la presencia de un organismos RLO (Lightner, 1996).

La necrosis hepatopancreatica y la Vibriosis son dos enfermedades importantes que ocasionan mortalidades en las granjas de camarón, el agente etiológico de la NHP es una bacteria intracelular, Gram negativa, pequeña y Pleomórfica, mientras que las especies de *vibrios*, son Gram negativas pero extracelulares, la diferenciación de estas dos enfermedades son importantes porque tienen diferente tratamientos y medidas preventivas.

Los resultados obtenidos en el análisis en fresco, mediante la observación de los signos clínicos como: cutícula blanda, cuerpo flácido, pleopodos de coloración café,

flacidez muscular, branquias ennegrecidas, expansión de cromatóforos, atrofia del hepatopaneas y reducción del crecimiento fueron similares a los resultados positivos mencionados por diferentes autores tales como Frelier (1992), y Lightner (1996), por lo tanto, las muestras analizadas mediante este método fueron positivas.

Al iniciar este estudio, los posibles agentes causales de la hepatopancreatitis que pudieron haber surgido, fueron bacterias del género *Vibrio* y las bacterias RLO, además de virus hepatopancreáticos (HPV, MBV), sospechándose además del IHHNV y WSSV. Sin embargo, los resultados señalan una bacteria semejante a las rickettsias, llamado NHP, en este primer estudio sistemático, realizado por microscopía de luz (preparaciones en fresco e histopatología), MET y PCR, se identifica a la bacteria NHP como el agente etiológico de la necrosis hepatopancreática en camarón blanco *L vannamei*.

Por microscopía de luz, los análisis en fresco y en preparaciones teñidas con Hematoxilina & Eosina se apreciaron la patología propia de la necrosis hepatopancreática y la presencia de colonias de bacterias Gram negativas, cuyas características han sido descritos por Frelier *et al.* (1992); Frelier *et al.* (1993) y Loy & Frelier (1996), al MET, se demuestra su similitud a las que han sido reportadas para el agente causal de la necrosis hepatopancreática de Texas, con formas cilíndricas predominantes que coinciden con la morfometría reportada para microorganismos similares a rickettsias en *L vannamei* cultivados en Texas (Krol *et al.* 1991 y Lightner *et al.* 1992), quienes las describen como formas primarias. Las formas intermediarias no se observaron al MET, siendo difícil su identificación porque analizamos solo tinciones

negativas. La forma helicoidal (terminal), presentó un máximo de ocho flagelos en el extremo basal de la bacteria lo cual coincide en morfometría a la descrita por Lightner *et al* (1992), así como también coinciden con las medidas morfométricas obtenidos en nuestro estudio.

Las muestras analizadas mediante la técnica de PCR resultaron positivas ya que amplificaron a 209 pb de acuerdo a los primers utilizados por Frelier y Loy (1996), f27: 5' ACATGCAAGTCGAACGCAATAGG y r235: es 5' ACAGATCATAGGCTTGGTAGGCTG., los cuales reconocen regiones variables del gen 16SrDNA de la bacteria NHP y amplifican a 209 bp, confirmándose previamente los sitios de anillamiento de los primers en la región ribosomal 16S RNA de la rickettsia en el GenBank

Con respecto a los parámetros físico químicos, las concentraciones de oxígeno disuelto durante el cultivo fueron de 4.3-7.0 ppm durante las mañanas y de 6.2-7.0 ppm, durante la tarde (Fig. 29). Huges, 1991, encontró que las concentraciones de oxígeno son afectadas por la temperatura y la salinidad, sin embargo los “bloom” de microalgas, la baja incidencia de vientos y altas temperaturas pueden también generar niveles críticos de oxígeno. Los niveles normales de oxígeno para *Litopenaeus vannamei* son de 2.5 – 3.0 ppm, valores inferiores pueden considerarse como críticos (Lucian-Brun, 1989), durante el ciclo las concentraciones de oxígeno permanecieron dentro de los valores recomendados.

La salinidad, registrada en los estanques en el ciclo de cultivo durante las 27 semanas fue de 40-52 gramos por litro (Fig.30). Durante el ciclo se observaron

condiciones de hipersalinidad en el agua. Se conoce que la salinidad afecta el metabolismo de los camarones y esta puede alterar el crecimiento (Kinne, 1964). En estudios realizados en *Litopenaeus vannamei* se ha comprobado que la salinidad isosmótica para esta especie es cercana a los 25 gramos/litro (Castille y Lawrence 1981). Es evidente que los camarones desvían parte de de la energía para mantener niveles adecuados de osmoregulacion, y por lo tanto son mas susceptibles a enfermedades como la necrosis hepatopancreática.

El Potencial de hidrogeno en los estanques de cultivo presentó valores de 7.4 - 9.0, lo cual se mantuvo dentro de los rangos recomendados por varios autores (Lucian-Brun, 1989; Boyd, 1990).

11 CONCLUSIONES

Se concluye que el DNA amplificado, corresponde al de la rickettsia NHP reportada en Perú y Texas, USA, y que las mortalidades reportadas en las granjas camaronicolas de Sonora de donde fueron seleccionadas las muestras, son causadas por NHP, ampliando la distribución geográfica de este microorganismo y reportando a la rickettsia NHP por vez primera en el pacifico Mexicano, como patógeno de camarón bajo condiciones de cultivo.

La secuenciación de los productos de PCR obtenidos en las amplificaciones de los aislados bacterianos de Sonora, registrados en el Gen Bank, con el numero de acceso AM411031, nos indican entre el 99% a un 100% de homología con la secuencia de Loy y Frelie,(1996), reportadas en el Gen Bank acceso U65509 que pertenece a la región ribosomal 16S RNA de la rickettsia NHP reportada en Texas y Perú. La ubicación de los amplicones en la posición esperada en los geles de agarosa, las observaciones ultraestructurales y al microscopio de luz, confirman que la causa de las epizootias en los ciclos de cultivo del 2004 fue la bacteria NHP. La salinidad en las áreas de estudio fue muy elevada, con un mínimo de 42 g/l. en Sonora, asociado a temperaturas mayores a los 32 °C. Al respecto se ha reportado en Texas, USA, Perú, Venezuela, Ecuador, Costa Rica y Panamá, que la temperatura y salinidad son factores medioambientales que juegan un papel muy importante en la NHP, donde periodos muy prolongados de temperaturas elevadas (>29 y hasta 30 °C) y elevada salinidad (20-40 g/l.) precedió el desarrollo de epizootias del 1993 al 1995 (Lightner, 1996).

Lo anterior indica que es necesario implementar programas de monitoreos sanitarios desde el inicio de la siembra, aunado a diagnósticos confirmatorios rápidos por PCR (Loy *et al.*, 1996; Briñez *et al.*, 2003) antes de iniciar con la aplicación de tratamientos con antibióticos u otras medidas de manejo recomendadas para enfermedades bacterianas, pues esta patología puede pasar desapercibida por días y repentinamente convertirse en un evento fuera de control. En resumen, la aplicación de ML, MET y PCR aunado a la técnica de ultracentrifugación en percoll, permitió identificar al agente causal de la hepatopancreatitis necrozante en México y conocer su distribución e impacto en los cultivos mexicanos

Por otra parte, trabajos preliminares sobre secuenciación, indican que el gen *gyrB* y no el 16S RNA de la NHP, es uno de los mejores candidatos para mostrar las diferencias de líneas celulares de la bacteria (USMSFP, 2004), pero además de esta cita no se encontraron reportes en las bases de datos que confirmen esta hipótesis.

Cabe aclarar, que este microorganismo ya es de declaración obligatoria para la Oficina Internacional de Epizootias, más aún, las mortalidades masivas obligan a implementar de forma inmediata medidas sanitarias emergentes como son los cercos sanitarios que eviten su dispersión hacia las zonas camaronícolas vecinas.

La temperatura superficial del agua durante el ciclo de cultivo presentó valores de 19 – 30°C en la mañana y 22- 34°C por la tarde, las temperaturas mas altas se registraron en los meses de julio y agosto con valores de hasta 34 °C, (Fig.28). Los rangos de temperatura optima para *Litopenaeus vannamei* son de 23-34°C, valores inferiores o superiores pueden ser letales (Lucien-Brun, 1986). También se conoce que a

temperaturas altas aumenta el potencial patógeno en los estanques de cultivo (Boyd, 1990), por lo que es importante mantener atención especial durante esta etapa.

Finalmente, los resultados obtenidos permiten asegurar que la bacteria NHP es patógeno primario del camarón blanco en condiciones de cultivo, con un impacto igual o quizá mayor, que el causado por los virus TSV y WSSV, por lo cual debe ser considerado en la lista A, por la Oficina Internacional de Epizootias, donde solo se citan los virus YHV (Yellow Head Virus=YHV) y WSSV.

12 RECOMENDACIONES

Construcción de estanques más profundos, para tratar de mitigar las temperaturas altas.

Recambio de agua, para mantener rangos de salinidades apropiadas.

Uso metáfiláctico de alimento medicado, con oxitetraciclina (de 1.5-4 kg. Por tonelada de alimento, por un período de 14 días continuos).

Realización de análisis presuntivos en fresco semanalmente en todo el ciclo de cultivo.

Comenzar con las medidas de prevención en cuanto inicie las primeras manifestaciones de la enfermedad.

Tener una agenda de todos los estanques de la granja, durante los años que tenga la granja, para tener una base de datos que sirvan para anticiparse al problema.

Tener alimento medicado disponible lo más rápido posible.

Calcular bien los periodos de medicación, ya que algunos residuos de antibióticos están restringidos para exportación a Estados Unidos de Norteamérica y Europa, ya que según estudios la oxitetraciclina tiene un periodo de eliminación en el camarón de siete días.

Se requiere hacer una buena diferenciación de la necrosis hepatopancreática y de las bacterias del género *Vibrio*, ya que los tratamientos y medidas preventivas son diferentes para cada etiología.

13 LITERATURA CITADA

- Alday-Sanz, V, Flegel TW. 1997. The risk of introducing yellowhead and whitespot viral infections from Asia to the Americas. In: Proceedings, Fourth Ecuadorian Aquaculture Conference, 22-27 October 1997, Guayaquil, Ecuador.
- Bell TA, Lightner DV. 1988. A handbook of normal shrimp histology. Special publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, FL.
- Briñez B, Aranguren F, Salazar M. 2003. Fecal simples as DNA Source for the diagnosis of Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstocks, Dis. Aquat. Org. 55, 69-72.
- Brock JA, Nakagawa, LK, Hayashi T, Teruya S, And Van Campen H. 1986. Hepatopancreatic rickettsial infection of the penaeid shrimp, *Penaeus marginatus* (Randall) from Hawaii. J. Fish Dis., 9, 73-77.
- Bonami JR, Trumper, B, Mari J, Brehelin M, Lightner DV. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. Journal of General Virology. 71:2657-2664.
- Boyd C. 1990. Water quality in ponds for aquaculture, In developments in aquaculture and fisheries science. Elsevier; New York. 482 pp.
- Boyd C. 1994. Taura Syndrome Workshop: executive summary, January, 21-22, 1994. University of Arizona, Tucson, AZ, USA. pp. 148.
- Castille FL, and, Lawrence, AL. 1981. The effect of salinity on the osmotic sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*, Comp. Biochem. Physiol. 68 A, 75-80 pp.
- Frelier PF, Loy, JK, Bell, TA. 1992. Treatment of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. Proc. Int. Coloq. Pathol. Mar Aquaculture. 5:30.
- Frelier FP, Loy, KJ, Kruppenbach, B. 1993. Transmission of Necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. J. Invertreb. Pathol. 61:44-48

- Frelier FP, Sis, FR, Bell, AT, Lewis, HD. 1992. Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Veterinary Pathology*. 29. Issue 4 269-277.
- Frelier PF, Loy, JK, Lawrence. 1994. Status of necrotizing hepatopancreatitis in Texas farmed shrimp, *Penaeus vannamei*. *Proc. World Aquacult. Soc.*
- Galavíz SL. 1999. Métodos de diagnóstico de WSBV-PCR. Memorias del Seminario Internacional sobre Patología y Bioseguridad en Camaronicultura. Purina Argribrands. Mazatlán Sinaloa. Junio 26, 1999.
- Gomez-Gil B, Tron-Mayen, L, Turnbull, JF, Inglis, V, Guerra-Flores, AL. 1998. Species of *Vibrio* spp. Isolated from hepatopancreas, hemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163:1-9.
- Johnson SK. 1989. Digestive gland manifestations, p.16 in SK Johnson (ed) *Handbook of shrimp diseases*, Sea Grant College Program, Texas A&M University, Galveston, Texas.
- Jonhson SK. 1990. *Handbook of shrimp diseases*. Sea Grant Publication No.TAMU-SG-90-601. Texas A&M University College Station.
- Kim WG. 1990. Molecular Phylogeny of Selected Decapod Crustaceans Based on 18 s rRNA Nucleotide Sequences. *J. Crustac. Biol.* 10, 1-13.
- Krol RM, Hawkins, W E, Overstreet, RM. 1991. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultures Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Invertreb. Pathol.* 57:362-370.
- Lightner DV. 1996. *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Lightner DV, Redman, RM, Bonami, JR. 1992. Morphologic evience for a single bacterial ethiology in Texas hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Dis. Aquat. Org.* 13:235-239.

- Lightner DV, Redman, RM, Williams, RR, Mohny, LL, Clerx, JP, Bell, TA. and Brock, JA. 1985. Recent advances in penaeid virus disease investigations. J. Worl. Maricult. Soc., 16, 267-274.
- Lightner DV, Redman, MR, Bomami, RJ. 1992. Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. (Crustacea: Decapoda). Dis. Aquat. Org. 13. 235- 239.
- Lightner DV, Redman, RM, Poulos, BT, Nunan, LM, Mari, JL, Hasson, KW. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 16:146-160.
- Lightner DV, Hasson, KW, White, BL, Redman, M. 1998. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. Journal of Aquatic Animal Health. 10: 271-281.
- Luedman RA, Lightner DV. 1992. Development of an in vitro primary cell culture system from the penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 101: 205-211.
- Lucien Brun, H. 1989. Guía para la producción de camarón en Ecuador. 1ª. Edición. 58, pp.
- Loy JK, Frelie, P, Varner, P, Templeton J W. 1996. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. Dis. Aquat. Org. 25:117-122.
- Loy JK, Frelie, P. 1996. Specific, nonradiative detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by in situ hybridization. J. Vet. Diagn. Invest. 8. 324-331.
- Loy JK, Dewhirst, EF, Weber, W, Frelie, FP, Garbar, LT, Tasca, IS, Templeton, JW. 1996. Molecular Phylogen and In Situ Detection of the Etiologic Agent of Necrotizing Hepatopancreatitis in Shrimp. Applied and Enviromental Microbiology. pp.3439-3445.

- Nunan ML, Poulos, B, Redman, R, Groumellec, L Marc, Lightner, DV. 2003. Molecular detection methods developed for a systemic rickettsia-like bacterium (RLB) in *Peneaus monodon* (Decapoda: Crustacea). *Dis. Aquat. Org.* 53, 15-23.
- Sambrook J, Russell, DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Nunan LM, Poulos, BT, Lightner, DV. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected shrimps. *Dis. Aquat. Org.* 34: 87-91.
- OIE (Office International de Epizootias). 1999. Diseases of crustaceans In: *International Aquatic Animal Health Code-1999*. Section 2.3. Office International de Epizooties, 12 rue Prony, 75017 Paris, France.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24, 4876-4882.
- Trudel M, Payment, P. 1993. Ultracentrifugation. Pp. 67-82 in M. Trudel and P. Payment (Eds). *Methods and Techniques in Virology*. Chap 8. Marcel Dekker, Inc., NY.
- USMSFP. 2004. Consortium Research Update January. 2004. U.S. Marine Shrimp Farming Program. www.usmsfp.org/news/consort.htm.

14. APÉNDICE

14.1. Preparación de reactivos para análisis de hibridación *in situ*.

- EDTA 10x Tris NaCl (TNE)

500 mM de Tris-HCl	60.57 g de Tris Base
100 mM de NaCl	5.84 g de NaCl
10 mM de EDTA	3.72 g de EDTA. 2H ₂ O (sal disódica)
DD H ₂ O	990 ml (qs a 1 L)

Llevar el pH a 7.4 con HCl, autoclave para esterilizar, almacenar a 4°C

Para hacer el TNE 1x, diluir 100 ml de TNE 10x en 900 ml de agua bidestilada, filtrar con un filtro de 0.45 µm, almacenar a 4°C.

- Proteinasa K

1x TNE	10 ml 1x TNE
Proteinasa K	1 mg de proteinasa K

- Formaldehído al 0.4%

Formaldehído al 0.4%	5.4 ml de formaldehído al 37%
Agua bidestilada	495 ml

Almacenar a 4°C

- Buffer de Hibridación (50 ml de volumen final)

SSC 4x	10 ml de SSC 20x
Formamida al 50%	25 ml de formamida al 100%
Denhardt 1x	2.5 ml de denhart 20x
Sulfato de dextrina al 5% 10 ml 25x de sulfato de dextrina	
0.5 mg/ml DNA	2.5 ml 10 mg/ml de DNA de
esperma de salmón	

Almacenar a 4°C

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

NaCl 3M 175.32 g de NaCl

Na citrato 0.3M 88.23 g de Na citrato 2H₂O

Agua bidestilada 900 ml (qs a un l)

PH a 7.0 autoclave para esterilizar; almacenar a 4°C

- Para hacer SSC 2x, diluir 100 ml de SSC 20x en 900 ml de agua bidestilada, filtrar con un filtro de 0.45 µm; almacenar a 4°C
- Para hacer SSC 1x, diluir 50 ml de SSC 20x en 950 ml de agua bidestilada, filtrar con un filtro de 0.45 µm; almacenar a 4°C
- Para hacer SSC 0.5x, diluir 25 ml de SSC 20x en 975 ml de agua bidestilada, filtrar con un filtro de 0.45 µm; almacenar a 4°C
- Para hacer SSC 0.1x, diluir 5 ml de SSC 20x en 995 ml de agua bidestilada, filtrar con un filtro de 0.45 µm; almacenar a 4°C

- Solución Denhardt 20x

BSA al 0.4% 0.4 g de suero de albúmina bovina,
fracción V

Ficoll al 0.4% 0.4 g de Ficoll 400

PVP 360 al 0.4% 0.4 g de Polivinilpirrolidone 360

Agua bidestilada 100 ml

Filtrar con un filtro de 0.45 µm; almacenar a 4°C

- Sulfato de Dextrina al 25%

Sulfato de Dextrina al 25% 2.5 g de sulfato de dextrina

Agua bidestilada 80 ml (qs a 50 ml)

Añadir el DNA lentamente al agua mientras se agita y caliente en “bajo”; qs a 50 ml.

Separar ocasionalmente el DNA con una jeringa y aguja calibre 18.

Esterilizar en autoclave para impulsar la desnaturalización del DNA, distribuir 2.5 ml de pequeños tubos, almacenar a -20°C

- Buffer I 10x

Tris-HCl 1M 121.1 g de Tris Base

NaCl 1.5M 87.7 g de NaCl

Agua bidestilada 900 ml (qs a 1L)

Llevar el pH a 7.5 con HCl, autoclave para esterilizar, almacenar a 4°C

Para hacer Buffer I 1x, diluir 100 ml de stock 10x en 900 ml de agua bidestilada, filtrar con un filtro de $0.45\ \mu\text{m}$; almacenar a 4°C

- Buffer II

100 mM de Tris-HCl 12.11 g de Tris Base

100 mM de NaCl 5.84 g de NaCl

Agua bidestilada 990 ml (qs a 1L)

Llevar pH a 9.5 con HCl 50 mM de MgCl

Filtrar con un filtro de $0.45\ \mu\text{m}$; almacenar a 4°C

- Buffer IV 10X

100 mM de Tris-HCl 12.10 g de Tris Base

10 mM EDTA 3.72 g de EDTA. 2H₂O (sal sódica)

Agua bidestilada 990 ml (qs a 1L)

Llevar el pH a 8.0 con HCl, autoclave para esterilizar, almacenar a 4°C

Para hacer el Buffer IV 1x, diluir 100 ml de stock 10x en 900 ml de agua bidestilada, filtrar con un filtro de 0.45 μm ; almacenar a 4°C

- Alcohol polivinílico al 10%

PV al 10% 10 gr de alcohol polivinilico (30,000-70,000 MW)

Agua bidestilada 90 ml (qs a 100 ml)

Agitar para disolver el PVA (calentar en “bajo” para facilitar la mezcla); distribuir 10 ml por tubo, almacenar a -20°C

- Solución desarrolladora (Añadir NBT y Fosfato-X sólo antes de su uso)

Buffer III 1x 90 ml de buffer III

PVA al 1% 10 ml de alcohol polivinilico al 10%

1 mM Levamisole 24 mg de Levamisole

Mezclar y almacenar a 4°C

Sal tetrazolium de Nitroazul 4.5 μm de NBT

(75 mg/ml en dimetilformamida al 70%)

5-bromo-4 cloro-3-indol fosfato 3.5 μl de fosfato-X sal de toluidinio

(50 mg/ml en dimetilformamida al 100%)

Buffer III con PVA y Levamisole 1 ml

- 0.5% Bismark Brown Y

0.5% Bismark Brown Y 5 g de Bismark Brown Y

Agua bidestilada 1000 ml

Agitar hasta que se disuelva completamente, filtrar con un papel filtro whatman 1, almacenar a temperatura ambiente.

RESUMEN CURRICULAR

José Cuauhtémoc Ibarra Gámez

Candidato para el grado de

Doctorado en Ciencias Biológicas con Especialidad en Sanidad Acuícola

Tesis: CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA (NHP) Y SU IMPACTO EN CULTIVOS DE CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* EN SONORA, MÉXICO.

Campo de Estudio: Acuicultura, Sanidad Acuícola

Datos Personales: Nacido en Ciudad Obregón, Sonora el 3 de Marzo de 1962, hijo de Manuel Ibarra Peña (finado) y Ana Alicia Gámez Ayala.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Biólogo en 1986 y Maestro en Ciencias, con Especialidad en Parasitología en 2000.

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo Titular A, del Instituto Tecnológico de Sonora, desde 1987, Investigador del Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Área de Acuicultura.

Responsable del Laboratorio de Sanidad Acuícola del ITSON desde 1999.

Miembro del consejo técnico, del Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, desde 2000.

Responsable por el ITSON del Programa Nacional de Sanidad Acuícola, de la SAGARPA-CONAPESCA.

Publicaciones: una en la revista científica **Aquaculture**, cuatro publicaciones técnicas en el Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y Red de Diagnóstico, UAM. Dos en **Gen Bank** con el número de acceso AM411031, un artículo aceptado para su publicación, como primer autor, en la revista científica **Ciencias Marinas**. Resumen aceptado para su presentación en el Congreso Mundial de Acuicultura, a realizarse en Febrero de 2007, en San Antonio Texas.