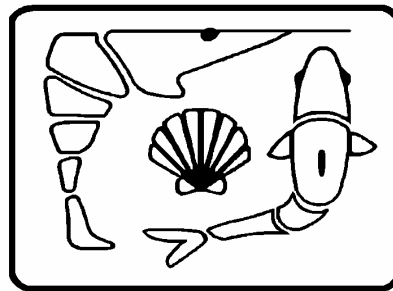


EL SABER DE MIS HIJOS
HARA MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA



RESPUESTA DEL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO, *Penaeus vannamei*
(BOONE, 1931), AL DESAFÍO DEL VIRUS DE LA CABEZA AMARILLA (YHV)
A DIFERENTES SALINIDADES

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS

presenta:

FREYMAN HUMBERTO NAVARRO NAVA

Hermosillo, Sonora

Junio del 2007

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para revisar la tesis de Freyman Humberto Navarro Nava, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Dra. Reyna Castro Longoria
Presidente

Dr. José Manuel Grijalva Chon
Secretario

Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Sinodal

Dr. Jorge Hernández López
Sinodal

DEDICATORIA

Para mí es un gran honor dedicarles este logro a mis **padres**, los cuales son dos de las personas más importantes dentro de mi vida, me refiero al **Sr. Humberto Navarro Lizárraga** y la **Sra. Lourdes Ramona Nava Lozano**, a los cuales amo, quiero, admiro, respeto. Ellos representan el ejemplo a seguir para mis hermanos y para mí, por ser unas personas comprensivas, cariñosas, inteligentes y trabajadoras que brindan el mayor de los esfuerzos y sacrificios para que todos nosotros salgamos adelante por la vida, de antemano mil gracias **padres**. Gracias por apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida desde mi niñez hasta ahora, por estar ahí en mis logros y alegrías, porque la verdad de que sirven si no los compartes con las personas que más amas en esta vida. Sin ustedes no sería nada en esta vida, de verdad gracias por todo.

A mi hermano **Dirceo Giovanni** por brindarme su apoyo en todo momento sea malo o bueno, te quiero y respeto hermano, a mi otro hermano **Ramón Gilberto** alias el **Camote, jajá aja** que te puedo decir tu eres el consentido, te quiero mucho, se que a pesar de que no te aguantas, yo que te conozco bien se que eres una persona centrada aunque muchas personas no lo crean, como te dije tente fe y confianza y todas las metas que te fijes la vas cumplir, échale ganas. Sabes que siempre tendrás todo mi apoyo en lo que desees hacer en la vida OK.

A mis dos hermanas **Cianya Milagros** y **Yesenia Citlalli** por todo su apoyo, las quiero hermanas aunque siempre se lleven molestándose mutuamente, les tengo fe a las dos se que tienen un futuro prometedor, son dos mujeres muy inteligentes aprovéchenlo para salir adelante tanto profesionalmente como emocionalmente; y ya saben que en lo que pueda apoyarlas lo haré gustoso.

Ahhhh!!!! Y no podrían faltar en esta dedicatoria mi cuñada, la Sra. **Judith Aimé Luna Trujillo** y mi **sobrino Ángelo Giovanni Navarro Luna** alias el **yelito**, es el bebe más bonito y grandote del planeta, lo quiero mucho al ahijado..

A mi esposa y madre de mi hija Camila, **Denisse Alejandra Trujillo Villalba** por todo su apoyo, cariño, comprensión, tolerancia, amor; Eres mujer a la que AMO y admiro muchísimo por ser original, inteligente, ocurrente y cariñosa.

A mis Abuelos paternos **Santos Lizarraga**, **Ignacio Uzeta Lizarraga** y **Magdaleno Navarro** por su apoyo y cariño. Igualmente a mis abuelos maternos **Martín Nava Escobar** (d.e.p) y **Victoria Lozano Navia** por su apoyo y cariño. A todos por igual los quiero, admiro y respeto.

AGRADECIMIENTOS

Al **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora** (DICTUS), por brindarme la oportunidad de entrar al programa de maestría y obtener este grado dentro de mi formación profesional.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por aceptarme dentro del programa de becas, y brindarme la oportunidad y herramientas necesarias para mi formación.

A una persona con gran calidez y calidad humana, mi directora de tesis, **Dra. Reina Castro Longoria** quien me apoyó en todo momento sin importar sus múltiples compromisos, por ser tan tenaz y optimista, logrando darme la confianza para afrontar los problemas de la mejor manera, muchas gracias doctora.

A mis sinodales **Dr. Jorge de la Rosa Vélez** por su valiosa colaboración al proporcionar la cepa viral de YHV de granjas, sin el no habría sido posible este trabajo. Al **Dr. José Manuel Grijalva Chon** y **Dr. Jorge Hernández López** por sus múltiples observaciones y correcciones logrando aumentar la calidad del trabajo de tesis, mil gracias.

A los profesores de la maestría en acuicultura por sus enseñanzas y conocimientos brindados por cada uno de ellos: Mayra González, Martín Pérez, Antonio López, Luís Enrique Millán, Nolberta, Reina Castro, Manuel Grijalva, Lorena Bringas, Luís Martínez, Alfredo Campaña, Carmina Garza, Eduardo Aguirre y demás profesores.

A la M. en C. Josefina Ramos Paredes, estudiante del doctorado, quien me apoyo en el proceso de hibridación *in situ* de las muestras de mi tesis.

A las secretarias del DICTUS Ana Claudia, Fátima y Panchita por su valiosa amistad, así como a los trabajadores de mantenimiento: el Niño, Abelardo y el físico Leo.

A todos mis **compañeros de la Maestría**: Edgar, Uriel, Ana Laura, Carlos, Luchi, Don Roberto, Miguel, Irasema, Alfredo, Karlita, Iván, Noel, José, Joel, Nelson, José Luís, Tito, Paty Celis, Ariana, Gloria, Rossana, Ángela, Tamara, Quintero (Genio) y a tres mujeres que no pudieron lograr esta meta: Zaira, Alma e Iris. A todos los estimo y respeto, mil gracias.

A mis compañeros y amigos de la casa “pelusa house”: **Fernando Jaimes Bustamante** y **Alberto Ulloa**, de verdad me la pase estupendamente bien con ustedes carnales, tantos momentos juntos que pasamos en las alegrías como en las tristezas (**por dinero no te preocupes, NO HAY**). Aja!! Toros, de verdad mil gracias por todo su apoyo y buenas críticas y comentarios hacia mi persona que me hicieron crecer personalmente, bueno espero darles el mismo apoyo cuando así lo requieran y ya saben que tienen un amigo que estará con ustedes en las buenas y malas, cuídense y sigan adelante les tengo fe.

A mi amigo Jesús Gómez Urcino, “neta brother” que nos la pasamos bien juntos en los conebios jaaja como en otras cosillas tu me entiendes jajajajaj, gracias por todo tu apoyo, yo se que vas a llegar lejos, eres un joven muy emprendedor sigue adelante y espero que nos volvamos a ver o mejor dicho no perder contacto para después vernos en mejor o situaciones distintas a las de ahora. Cuídese “compa”.

A mis compañeros y amigos de la **FACIMAR Mazatlán**: Gabriel (carry), Erick, Alkair, Iván (greñas), palatas, Neker, Sara, Flor, Itha, Emerita, Adana, Priscila, Nayelli, Georgina, Ana, Raúl y al que considero hasta la fecha mi mejor amigo y hermano **Efraín Moreno**, gracias a todos los respeto, quiero y estimo.

A **Laboratorio de estudios ambientales**, fue el pilar para que me siguiera formando profesionalmente, gracias Gabriel López, güero, Isidro e Izaguirre.

A quien considero un ejemplo a seguir, el Dr. Domenico Voltolina, gracias por su recomendación y por haber confiado en mí, lo estimo y respeto mucho.

CONTENIDO

	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS.	i
ÍNDICE DE TABLAS.	iii
RESUMEN.	iv
ABSTRACT.	v
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.	1
II. OBJETIVOS.	6
II.1. Objetivo General.	6
II.2. Objetivos Particulares.	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	7
III.1. Transporte y aclimatación de organismos.	7
III.2. Diseño experimental.	7
III.3. Preparación del inóculo viral e infección experimental.	8
III.4. Colecta de muestras.	9
III.5. Obtención de tejidos.	10
III.5.1. Histología.	10
III.5.1.1. Deshidratación, inclusión en parafina y corte.	10
III.5.1.2. Tinción y montaje de los cortes.	11
III.6. Protocolo de hibridación <i>in situ</i> .	11
III.7. Extracción de ARN para la detección de YHV por RT-PCR mediante el juego de reactivos IQ2000	13
III.7.1. Protocolo de amplificación de ARN.	14

III.7.1.2. Procedimiento para la reacción de retrotranscripción y amplificación de ARN.	14
III.8. Electroforesis e interpretación.	15
III.9. Análisis de datos.	15
IV. RESULTADOS.	17
IV.1. Observación de células infectadas.	17
IV.2. Histopatología e hibridación <i>in situ</i> .	23
IV.3. Análisis de RT-PCR.	23
V. DISCUSIONES.	31
VI. CONCLUSIONES.	37
VII. RECOMENDACIONES.	39
VIII. LITERATURA CITADA.	40
IX. ANEXOS.	47
X. APÉNDICES.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Diseño experimental para el desafío del virus de la cabeza amarilla YHV, sobre <i>Penaeus vannamei</i> , 1= Control negativo, 2-4= Replicas por tratamiento y 5= Control positivo para seguir el curso normal de la infección. N= 25 camarones / tratamiento (ppt = psu).	8
2	Patrón de bandeado en gel proporcionado por el juego de reactivos IQ2000, para propósitos de comparación de muestras problema a analizar con diferentes grados de infección de YHV y GAV. Carriles 1, 2 y 3: estándares positivos para YHV; Carriles 4, 5 y 6: estándares positivos para GAV.	16
3	Promedio y desviación estándar del número de células infectadas de 30 observadas en branquias de camarón infectado por YHV en tres acuarios experimentales y a salinidades de 5, 15, 25 y 40 psu.	18
4	Promedio y desviación estándar del número de células infectadas de 30 observados en órgano linfoide de camarón infectado por YHV en tres acuarios experimentales y a salinidades probadas de 5, 15, 25 y 40 psu.	18
5	Conteo de las células infectadas en los camarones individuales que fueron muriendo en el experimento control con YHV a 5 y 15 psu.	19
6	Número de las células infectadas en los camarones individuales que fueron muriendo en el experimento control con YHV a 25 y 40 psu.	20
7	Porcentaje de infección celular a 28 °C durante el tiempo de experimentación del virus YHV sobre <i>P. vannamei</i> a las diferentes salinidades, 5, 15, 25 y 40 psu en controles positivos con camarones moribundos.	21
8	Supervivencia en acuarios controles positivos, causada por la infección del virus de la cabeza amarilla sobre <i>P. vannamei</i> a 28 °C. Cada punto representa a un camarón moribundo. (N = 20).	22

- 9 A) Corte histológico a 5 μm de órgano linfoide de *P. vannamei* con evidente picnosis y cariorresis celular (señalado con flechas) e infectado por el virus de la cabeza amarilla (YHV), mediante la técnica H&E. B) Hibridación *in situ* en órgano linfoide de *P. vannamei* donde se observan (flechas) las células positivas al virus de YHV. Camarón infectado a 40 psu. Barra 10 μm . 24
- 10 A) Corte histológico de branquias a 5 μm de camarón infectado, que demuestra picnosis y cariorresis nuclear (flechas). Técnica H&E. B): Hibridación *in situ* positiva donde se observa la reacción de la sonda específica en la detección del virus de la cabeza amarilla YHV, camarón infectado a 15 psu. 25
- 11 Ejemplo de electroforesis que muestra el análisis de RT-PCR de la infección viral experimentada por *P. vannamei* a 5 psu. En la parte superior se observan las muestras en los carriles 1: camarón control infectado a 21 hpi con resultado negativo. Carril 2 de 24 hpi con resultado negativo a YHV. Los carriles 3-5: 48, 72 y 96 hpi son severos a YHV; el carril 6 a 120 hpi muestra un resultado positivo ligero a YHV; el carril 7 a 24 hpi fue negativo a YHV. Por ultimo el carril 8 de 24 hpi fue negativo a YHV. Y2=control positivo de YHV con 200 copias de reacción; Y1=control positivo a YHV con 2000 copias de reacción; N=control negativo a YHV; M = Marcador de peso molecular de 848 bp, 630 bp y 333 bp. 26

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
I	Compilación de resultados del análisis de RT-PCR con IQ2000 a partir de los patrones de bandeo de las electroforesis en branquias de <i>P. vannamei</i> sobre la infección experimental del virus de la cabeza amarilla (YHV). (+) Camarón con detección positiva ligera a YHV; (*+) camarón con detección positiva severa a YHV; (ND) No detectado en la electroforesis. Los datos son producto de la interpretación del bandeo en las electroforesis para cada camarón.	28
II	Análisis individual de RT-PCR (grado de infección) por el juego de reactivos de IQ2000 en camarones moribundos al tiempo (t) en horas,h, y días (entre paréntesis) del curso de la infección en los acuarios del control positivo. Se demuestra el curso de la infección natural a YHV a diferentes salinidades. * =infección severa.	29

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la respuesta del camarón blanco, *Penaeus vannamei*, al desafío con el virus de la cabeza amarilla (YHV) a salinidades de 5, 15, 25 y 40 psu bajo condiciones de laboratorio. En el experimento se analizaron por histología, hibridación *in situ* y RT-PCR un total de 100 camarones provenientes de cultivo, con un peso promedio de 18.28 ± 2.04 g. Para ajustar las salinidades, los organismos se aclimataron a razón de 2 psu/hr durante una semana previa al desafío. Se les proporcionó alimento comercial a un 5 % de la biomasa total con aireación constante, a temperatura de 28 °C. La densidad manejada fue de 25 org/m², en acuarios de 60L en tres réplicas por tratamiento, con sus controles positivo y negativo. Se aplicó una inyección de inóculo de extracto de tejido infectado de *P. vannamei* con YHV así como un extracto libre del virus a cinco camarones por acuario. Se inyectaron los camarones experimentales con una dosis de 180 µl del extracto, entre el segundo y tercer segmento abdominal sobre la superficie ventral; los camarones de los controles negativos fueron inyectados solo con solución salina al 2% para igualar la condición de estrés. Después de la infección, se colectaron tres organismos cada 24 h por tratamiento durante cinco días. Los camarones de los controles positivos fueron muestreados solo al observarse moribundos. Mediante análisis histológico, se observaron daños severos en branquias y órgano linfóide con picnosis y carreorexis celular. De igual forma, se observaron daños severos a través de hibridación *in situ*, el cual mostró reacción positiva a la sonda molecular en órgano linfóide y branquias con evidentes signos clínicos específicos del YHV. Para el análisis por RT-PCR se empleó el juego de reactivos (IQ2000) para confirmar la existencia del virus. En la electroforesis se observó en gel de agarosa al 2.0 %, una banda positiva de 277 pb teñida con Bromuro de Etidio. De acuerdo con los resultados con el curso de la mortalidad debida solamente al virus y a los resultados de RT-PCR de los organismos analizados por espacio de 24 horas, la mayor virulencia se expresó en los camarones sometidos a salinidades extremas de 5 y 40 psu donde murieron en 4.96 y 5.96 días con un porcentaje de severidad de infección del 40% y 27%, valorado mediante la escala de infección de IQ2000. Además se demostró un mayor soporte a la infección experimental en salinidades próximas o dentro de las condiciones isosmóticas idóneas para *P. vannamei* de 15 y 25 psu, ya que los organismos vivieron mayor tiempo, 15 y 22.6 días con infecciones bajas del 13% y 0% respectivamente. Se concluye que la salinidad es un factor determinante en el disparo de la virulencia de YHV, por lo que los sistemas de salinidades extremas pueden estar sujetos al riesgo de mayores cuadros de ataque por el virus de la cabeza amarilla.

ABSTRACT

In this study we evaluated the response of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, challenged with the yellow head virus (YHV) at treatments of salinities of 5, 15, 25 and 40 psu in laboratory conditions. There were analyzed 100 (18.28 ± 2.04 g) shrimps by histology, *in situ* hybridization and RT-PCR by the IQ2000 kit. Salinities were reached one week before the challenging by acclimatizing shrimps at $2 \text{ psu} \cdot \text{h}^{-1}$ with filtered at $4 \mu\text{m}$ and sterilized UV sea water. Commercial food pellets were administrated at 5 % of shrimp biomass at $28 \text{ }^\circ\text{C}$ and oxygen supply. Five shrimps were distributed in triplicate 60L aquaria ($25 \text{ org}/\text{m}^2$) taking into account a negative and positive control. There was inoculated an extract ($180 \mu\text{l}$) of infected tissue with YHV and injected on the second and third ventral segments of the five *P. vannamei*. Also the negative controls were injected with saline solution 2% to equally the stress condition shrimps. After the challenge, there were sampled one shrimp at time intervals of 24 h during five days. Positive control infected shrimps were sampled only at the moribund condition. The histopathology analysis demonstrated severe damage in the cells of gills and lymphoid organ demonstrating pycnotic and cellular karyorexis due to the YHV. In the same way the *in situ* hybridization demonstrated positive results with the molecular probe in the lymphoid organ and gills. RT-PCR results indicated the 277 pb in the electrophoresis of the different salinities. The results of the positive controls and the sampled shrimps demonstrated higher virulence in the challenged shrimps in 5 and 40 psu, where it died at 4.96 and 5.96 days long and demonstrated the higher severity of 40% and 27%, evaluated by infection scale of IQ2000. Furthermore, we found that in salinities near and isosmotic ideal conditions for *P. vannamei* at 15 and 25 psu, the shrimps were living more time, 15 and 22.6 days and with low infection of 13% and 0%. We concluded that the salinity is determinant in the survival of the shrimps and can triggering the virulence of YHV. According to our results, shrimp aquaculture in systems of extreme salinity could be subjected to high risk, if YHV is present.

I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

La importancia de la acuicultura, su desarrollo y los grandes beneficios socioeconómicos, han sido reconocidos ampliamente por representar unos de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento (Montoya-Rodríguez y López-Félix, 2000). El despertar de la acuicultura en el Pacífico Mexicano puede ser atribuido a dos causas principales: el éxito obtenido en otros países de América Latina, principalmente en Ecuador, lo cual sirvió como ejemplo empresarial con niveles de inversión limitados. A su vez la otra causa del avance de la acuicultura fue el desplome en la rentabilidad de la producción en la pesca del camarón en los cuerpos de agua costeros, asociado a los altos costos de la explotación de este recurso pesquero en la plataforma continental (Hendrickx, 2001).

La camaronicultura es considerada como una actividad encaminada a satisfacer las necesidades del ser humano, así como la de establecer comunidades económicamente viables en áreas rurales donde se da la mayor parte de la producción. Sin embargo, el impacto ambiental ocasionado por esta actividad sobre los ecosistemas adyacentes, las especies nativas y por supuesto el hombre mismo, es difícil de evitar (Soto, 2000). A pesar de esto ninguna actividad económica ha alcanzado en los últimos años un crecimiento tan acelerado como la camaronicultura en las áreas tropicales y subtropicales costeras del mundo (Páez-Osuna, 2001).

En años recientes, la producción de camarón cultivado en México se incrementó de 4371 t en 1990 a 62,361 en el 2003, lo cual representó cerca del 54% del total de la producción de camarón en México (SAGARPA, 2003). El 95% del total de la producción de camarón cultivado pertenece a las costas del Pacífico, principalmente los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit. No obstante, la actividad acuícola tiene que enfrentar algunos desafíos para su posterior desarrollo. Los más importantes son: a) diseño de dietas adecuadas y económicas que permitan reducir los costos de producción, b) abastecimiento de postlarva de buena calidad, producidas en laboratorios para la siembra de estanques, c) manejo eficiente de los sistemas de cultivo; y, d) la detección, prevención y control de epizootias que puedan afectar significativamente a esta industria (Unzueta-Bustamante, 2000).

Este último aspecto constituye uno de los puntos clave en la producción de camarón, puesto que la dispersión de patógenos exóticos entre lugares distantes puede ocasionar pérdidas económicas significativas.

Además la intensificación de los sistemas de cultivo y la eutroficación del medio han contribuido a la aparición de nuevas enfermedades, que limitan el desarrollo de la acuicultura. Algunas de ellas como las enfermedades parasitarias, micóticas y bacterianas pueden ser técnicamente controladas con medidas profilácticas y métodos terapéuticos. Sin embargo, no existe tratamiento eficaz para las enfermedades virales, por lo que sólo las medidas de prevención pueden ser consideradas (Montoya-Rodríguez y López-Félix, 2000). Esto hace que la detección oportuna para el control de las enfermedades virales sea de absoluta prioridad, para asegurar el éxito en los cultivos de camarón en cualquier región del mundo (Bonami, 1997).

Sobre el particular, la propagación de los virus exóticos puede ser atribuido a diferentes formas de introducción. La historia ha dado ejemplos de la introducción de enfermedades de animales por transportación de lotes infectados dentro de áreas no afectadas (Schnurrenberger *et al.*, 1987). Además, varios son los vectores y transportadores de enfermedades, como por ejemplo, las aves, (Wood *et al.*, 1986; Peters y Neukirch, 1986; Garza *et al.*, 1997) y también por importación y procesamiento de productos de alimento congelado (Humphrey, 1995). Se ha enfatizado que los países que realizan introducciones, importaciones o traslados de organismos acuáticos, deberán aplicar una legislación para regular, coordinar, revisar y dar seguimiento a dichas actividades (Prieto *et al.*, 1995).

Algunos de los virus que afectan a los camarones han sido nombrados de acuerdo a las características de las enfermedades o síndromes que provocan, o por la ubicación geográfica, lugar donde son detectados por primera vez, así como por su localización dentro de los tejidos de los crustáceos (Lightner, 1998). Así, los principales grupos han sido clasificados en ocho familias que son: *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Parvoviridae*, *Baculoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Iridoviridae* y *Roniviridae* (Lightner, 1998). Dentro de estas familias, se conocen más de veinte virus causales de enfermedades en los crustáceos de cultivo, y de ellos, cuatro son los más estudiados por sus formas de transmisión y potenciales efectos adversos para la industria internacional del camarón. Estos son, el Virus de la Necrosis Infecciosa del Tejido Hipodérmico y Hematopoyético (IHHNV), el Síndrome del Virus del Taura (TSV), el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) y el Virus de la Cabeza Amarilla, YHV (Zarain-Herzberg y Ascencio-Valle, 2001).

El nivel de virulencia en ellos difiere, ya que los más patógenos son el WSSV y el YHV. Estos agentes causales han provocado mortalidades masivas en *Penaeus monodon*, principal especie de cultivo en Tailandia hasta el 2001 (Flegel, 2006).

Desde hace más de una década, fue establecido el impacto económico negativo, ocasionado por virus en las especies de camarón cultivado, *P. stylirostris* y *P. vannamei*, dentro de las granjas camaronícolas de México, en el orden de hasta 25 millones de dólares anuales (Hasson, 1998), con pérdidas hasta del 90% en la producción de camarones cultivados (Lightner, 1996). Conroy y Conroy (1990) sugieren que para controlar la diseminación de enfermedades y epizootias en la acuicultura, es vital que se considere de máxima prioridad la utilización de métodos y técnicas que permitan un diagnóstico rápido de dichas enfermedades y cuando sea posible, el reconocimiento temprano de los signos etiológicos en la población y/o en el ambiente de cultivo.

Por otro lado, un aspecto que ha llamado la atención dentro del sector acuícola es la relación del problema del WSSV con epizootias menos severas en algunas granjas (Lightner, 1996), por lo que se piensa que los factores fisicoquímicos pudieran estar involucrados, como por ejemplo, la temperatura y la salinidad. La salinidad es un factor ambiental muy importante y poco estudiado en el cultivo de camarón debido a que las variaciones de esta, influyen significativamente en la fisiología de los peneidos, lo cual repercute en su eficiencia metabólica y se manifiesta con cambios en el consumo de oxígeno, velocidad de crecimiento y supervivencia (Pequeux, 1995).

No obstante lo señalado arriba, algunos organismos pueden habitar exitosamente sistemas acuáticos con diferentes regimenes de salinidad, debido a su capacidad de regular el agua y los solutos inorgánicos internos, con un medio interno apropiado para las interacciones moleculares. En este sentido, la osmoregulación es una de las funciones reguladoras más importantes de los organismos acuáticos (Pequeux, 1995). El camarón blanco del Pacífico, *P. vannamei*, es uno de los más activos y eficientes animales eurihalinos osmorreguladores, ya que mantienen su concentración osmótica por debajo de la salinidad del agua de mar (Dall *et al.*, 1990).

La salinidad óptima para el cultivo de *P. vannamei* no ha sido bien determinada, pero para el desempeño biológico de la especie, de acuerdo con Boyd (1980), una salinidad entre 15 – 25 psu, es considerada como la ideal. En ausencia de virus, Bray *et al.*, (1994) estudiaron el efecto de la salinidad sobre el crecimiento y supervivencia en juveniles de camarón blanco. Ellos encontraron un crecimiento mayor de 2 g por

semana en salinidades más bajas de 5 y 15 psu y con un peso final significativamente mayor que a 49 psu; mientras que, en la supervivencia no hubo diferencias significativas entre tratamientos de 5 a 49 psu. Sin embargo, estos resultados corresponden a camarones sanos.

El virus del síndrome de la cabeza amarilla (YHV) se detectó por primera vez en Tailandia en 1992 (Booyaratpalin *et al.*, 1993; Chantanachookin *et al.*, 1993). Este virus se distribuye en regiones de cultivo de Indonesia, Malasia, China, Filipinas y Taiwán. En el sur de Texas se detectó por primera vez en *Penaeus setiferus* en 1995 (Lightner, 1996). Dadas las irregularidades de los movimientos de larvas, reproductores, camarón congelado y crudo, es posible que este virus en un futuro sea cosmopolita al igual que WSSV y TSV (Lotz, 1997).

Las especies de camarones peneidos de Hawai y del oeste del hemisferio, como *Penaeus stylirostris*, *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum*, *Penaeus setiferus* y *P. vannamei*, son susceptibles a infección experimental con YHV (Lu *et al.*, 1994; Lightner *et al.*, 1998). Se ha encontrado que existe una relación entre la talla y edad con la susceptibilidad a la enfermedad viral (Wang, *et al.*, 1996). La caracterización extensiva del genoma de YHV (Sittidilokratna *et al.*, 2002; Cowley y Walter, 2002; Jitrapakdee *et al.*, 2003) ha mostrado claramente que es un virus de RNA clasificado en el nuevo género *Okavirus* y familia Roniviridae, en el orden Nidovirales (Mayo, 2002). Este virus causó pérdidas significativas en cultivos de *P. monodon* por todo Asia (Chantanachookin *et al.*, 1993; Flegel, 1997). Los camarones infectados presentan un incremento en la tasa de alimentación y posteriormente cesan. Su nado es errático cerca de la superficie del estanque y frecuentemente muestran una coloración amarilla pálida en el cefalotórax y branquias (Chantanachookin *et al.*, 1993).

La severa necrosis del órgano linfoide es quizás una de las lesiones típicas y visibles causadas por YHV. Camarones con una aguda infección muestran celularmente, un núcleo generalizado con una necrosis severa difusa, con prominente picnosis y cariorresis, acompañado por cambios degenerativos extensivos de este órgano (Booyaratpalin *et al.*, 1993; Chantanachookin *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996). Dicha necrosis destruye las células parenquimales del órgano linfoide y las células del tejido conectivo fibroso y por ende, el efecto sobre las especies de peneidos es letal.

En México, YHV fue detectado presuntivamente en el año de 1999 en granjas de camarón azul y blanco cultivado en el estado de Nayarit, Sinaloa y Sonora con una

prevalencia global del 40%, aunque en niveles muy bajos de infección (De la Rosa-Velez *et al.*, 2006). Méndez-Payán (2003) lo detectó en granjas del estado de Sinaloa y Nayarit en el 2000, con una prevalencia inferior del 11.8 % global en *P. vannamei*. Quintero-Arredondo (2003), también detectó presuntamente por Histología y RT-PCR a YHV en el camarón azul silvestre, *Penaeus stiyrostris*.

A raíz de estos estudios se ha propuesto realizar un mayor esfuerzo en la investigación de YHV en México, pero hasta donde se conoce no existen investigaciones sobre la problemática de dicho virus a nivel nacional donde se aborde su introducción, presencia, condiciones fisicoquímicas favorables para su infección y dispersión en los organismos. Este es un problema que no debe dejarse de lado por las implicaciones económicas que pudieran ocasionar a la camaronicultura nacional. En este contexto, la dispersión hacia sistemas diferentes con regimenes de salinidades variables debe de ser evaluada como una primera aproximación a la determinación de su virulencia en el ambiente.

En el presente estudio, se pretende observar la respuesta del camarón blanco al desafío del virus de la cabeza amarilla a diferentes salinidades, para determinar las condiciones óptimas de respuesta a la infección experimental. La hipótesis que se pretende probar es que no existirá diferencia en la virulencia de YHV sobre *P vannamei* al desafío en los camarones sometidos a diferentes salinidades.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo General.

Evaluar la respuesta del camarón blanco, *Penaeus vannamei*, al desafío del virus de la cabeza amarilla (YHV), a diferentes salinidades.

II.2. Objetivos Particulares.

- a) Determinar la virulencia de YHV sobre el camarón blanco sometido a salinidades de 5, 15, 25, y 40 psu, a 28°C.

- b) Valoración de la respuesta del camarón al virus mediante análisis histopatológico, RT-PCR e Hibridación *in situ*.

- c) Valoración de supervivencia y mortalidad del camarón infectado con YHV.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Transporte y aclimatación de organismos.

Se trabajó con camarones adultos cultivados del camarón blanco de *Penaeus vannamei*, con un peso promedio de 18.28 ± 2.04 g, los cuales fueron transportados de la Unidad Experimental Kino del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora al Laboratorio de Ciencias del Mar de la misma institución en Hermosillo, Sonora. Durante el transporte se redujo la temperatura de 28 a 21°C para disminuir el metabolismo y evitar el aumento de la concentración de nitrógeno amoniacal total en el contenedor de transporte.

En el laboratorio se midió la concentración de oxígeno disuelto en los acuarios, el cual fue de 8 mg/L. El tiempo de aclimatación para lograr la salinidad deseada fue variable en cada tratamiento, esto debido al ajuste de las diferentes salinidades manejadas (5, 15, 25 y 40 psu). Se disminuyó y/o aumentó la salinidad según la deseada a razón de 2 psu/h. Esta última se incrementó mediante la adición de sales marinas. Una vez aclimatados, los camarones se mantuvieron durante una semana en estado de reposo para eliminar cualquier tipo de estrés en los camarones y no producir resultados erróneos.

III.2. Diseño experimental.

Se diseñó un experimento para las salinidades de 5, 15, 25 y 40 psu (Figura 1). Se colocaron cinco camarones por acuario de 60 litros y por triplicado para cada salinidad. Igualmente se colocó un acuario control con camarones sin infectar para observar los cambios naturales de los organismos. Otros acuarios fueron considerados por salinidad como controles testigos infectados (CTI) para evaluar la mortalidad, en estos se dejó correr el curso de la infección por YHV en los organismos con el objeto de registrar la mortalidad debida al virus. En los CTI, se detuvo el experimento hasta que murió el último camarón y se registraron los tiempos al momento de ser extraídos de los acuarios en condiciones de muerte inminente. En todos los acuarios la temperatura permaneció constante a 28 °C. El agua que se utilizó para el experimento fue pasada por filtros de hasta de 4 μ m y posteriormente esterilizada por UV.

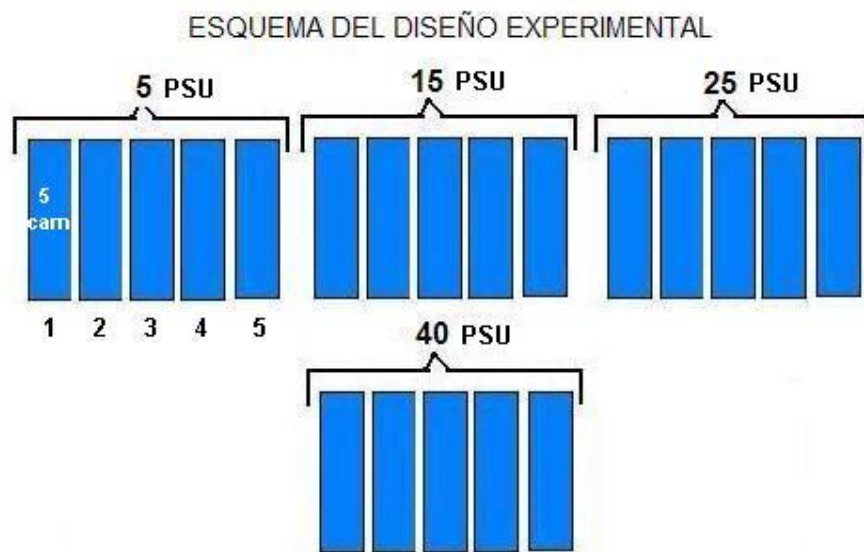


Figura 1.- Diseño experimental para el desafío del virus de la cabeza amarilla YHV, sobre *Penaeus vannamei*, 1= Control negativo, 2-4= Réplicas por tratamiento y 5= Control positivo para seguir el curso normal de la infección. N= 25 camarones/tratamiento.

III.3. Preparación del inóculo viral e infección experimental.

La obtención del virus se realizó a través de una muestra de organismos positivos a YHV, tomados de diferentes granjas analizadas en el Noroeste de México. Primeramente, a partir de tejido infectado por YHV, se propagó el virus positivo en el laboratorio en cinco camarones. Después, los organismos fueron analizados y confirmados a YHV. La infección experimental del desafío se realizó mediante tejido muscular mezclado y homogeneizado con solución salina al 2 % a una concentración 1:10 w/v. Posteriormente, se centrifugó el homogenizado a 12,000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se diluyó nuevamente 1:10 con solución salina al 2 %, para inyectar intramuscularmente con una dosis de 180 μ L entre el segundo y tercer segmento abdominal sobre la superficie ventral de los camarones. Los camarones de los grupos control negativo fueron inyectados con tejido muscular de camarón confirmado negativo por RT-PCR de organismos sanos, con la misma metodología antes descrita en la infección positiva.

Los animales se mantuvieron en acuarios a temperaturas de 28 °C y a salinidades experimentales. Posterior a la infección, los camarones fueron alimentados con alimento comercial al 5 % de su peso corporal. Para seguir el efecto de la

propagación viral en las salinidades experimentales, se realizaron inspecciones de los organismos durante el experimento cada cuatro horas por cinco días.

III.4. Colecta de muestras.

Se tomaron muestras de un camarón por acuario cada 24 h (3 camarones/tratamiento) a las diferentes salinidades manejadas (5, 15, 25 y 40 psu) con su correspondiente muestra tomada del grupo de control negativo. De cada tratamiento, solo se muestrearon los organismos del control positivo, cuando se observaron en estado moribundo. La colecta de muestras en el experimental tuvo una duración de cinco días. El tejido muscular fue inmediatamente congelado a -70 °C para su posterior análisis de RT-PCR.

Las branquias de cada camarón se almacenaron en alcohol absoluto al 100% en frascos de polipropileno debidamente etiquetados para su posterior análisis a través de RT-PCR con el juego de reactivos de IQ2000TM (YHV/GAV Detection and Typing System, Farming IntelliGene). El cefalotórax de los organismos muestreados fue etiquetado y depositado en frascos con solución Davidson “amigable” (ANEXO 1) para evitar la degradación de RNA; posteriormente, se colocaron en alcohol al 70%; y finalmente, se observó el daño causado por el virus a través del método tradicional histológico de H&E.

Tanto para histología como para hibridación *in situ*, el proceso de fijación en los camarones se realizó lo más rápidamente posible. Esta medida preserva los tejidos al detener la autólisis, para luego aplicar los subsecuentes tratamientos. Idealmente, los tejidos se endurecen ligeramente pero no se fragmentan, lo cual permite que las estructuras tisulares no se encojan y que estén muy cerca del estado celular natural (Prophet *et al.*, 1992). El fijador que se empleó fue la solución de Davidson “amigable”, en un volumen aproximado de 10 % del cuerpo del organismo (Lightner *et al.*, 1988).

Con dicha solución, se inyectaron a los camarones en el cefalotorax hasta observar un cambio a color anaranjado. Después, los camarones se sumergieron envueltos en gasas en la solución Davidson a temperatura ambiente; posteriormente, a las 48 h las muestras se colocaron en etanol al 70%, para su conservación.

III.5. Obtención de tejidos.

III.5.1. Histología.

Para el análisis histológico de Hematoxilina - Eosina H&E, se trabajó con la totalidad de los camarones (N=100) bajo el siguiente procedimiento:

- 1) se extrajo al organismo de la solución de preservación y se colocó sobre una superficie limpia;
- 2) con un escalpelo se disecó dorsoventralmente, a la altura del cefalotórax, detrás de la primera espina rostral; para obtener una sección completa de aproximadamente 2 mm de espesor. Con este corte, se garantiza la presencia de secciones de hepatopáncreas, branquias, órgano linfoide, sistema digestivo y gónadas.
- 3) también, lateralmente al cefalotórax, se cortó una de las superficies distales, es decir, la región de las branquias.
- 4) los cortes se colocaron en casetes para su proceso histológico, que empezó con deshidratación (Lightner, 1988).

III.5.1.1 Deshidratación, inclusión en parafina y corte.

El equipo empleado para el deshidratado fue un procesador automático de tejidos modelo TISSUE-TEK II de Sakura Finetechnical Co. Ltd. Este fue programado para 12 horas de trabajo con las muestras en alcohol de concentración creciente. El protocolo se muestra en el ANEXO 2. Posteriormente, las muestras se incluyeron en parafina en moldes, por medio del inclusor de parafina Leica, modelo EG1160. De los moldes en parafina se obtuvieron los bloques con el tejido, para posteriormente cortar en un micrótopo rotatorio, AO Scientific Instruments. Se obtuvieron montajes de secciones seriadas de tejido de 5 μ m.

Para el montaje de cortes seriados en portaobjetos, se utilizó un baño de tejidos, con grenetina y temperatura controlada de 45 °C. Los portaobjetos con el corte de tejido se desparafinaron a 56 °C en horno, para llevar a cabo el proceso de tinción posterior de H&E.

III.5.1.2. Tinción y montaje de los cortes.

La secuencia de tinción H&E (ANEXO 3) se encuentra descrita en Lightner (1996). El paso final en la preparación de una laminilla o portaobjetos, consistió en cubrir con resina y cubreobjetos la porción que contuvo el tejido. La interpretación de las laminillas fue realizada mediante la observación y el análisis de 30 células por campo en tejido de órgano linfoide y branquias de cada camarón y se determinó cuantas

células realmente presentaban algún signo clínico de la enfermedad causada por el virus. Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, en el conteo de células entre los tratamientos del experimental (Conover, 1971).

III. 6. Protocolo de Hibridación *in situ*.

El proceso de Hibridación se describe según la metodología propuesta por Lightner (1996). Los tejidos fijados con solución Davidson (AFA) han sido utilizados exitosamente con el procedimiento de hibridación *in situ* (Lightner, 1996). También, los tejidos fijados con otros agentes, tales como el glutaraldehído pueden ser usados con este protocolo. Además, esta técnica puede ser usada con secciones de tejidos congelados. A continuación se presenta el protocolo seguido:

- a) Los tejidos en parafina fueron cortados en secciones de 4 μm . y colocadas en portaobjetos, previamente cargados positivamente.
- b) Se calentaron las laminillas en un horno por 45 minutos, a 60° C.
- c) Se rehidrató el tejido con alcohol decreciente como se observa en el ANEXO 4.
- d) Se preparó 50 $\mu\text{g/ml}$ en 1x TNE de proteinasa K (PK) fresca. Se agregó 1 mL de solución PK sobre portaobjetos y se incubó por 30 minutos a 37 °C en una cámara húmeda.
- e) Se colocó formaldehído del 4 % en cada portaobjetos por 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron las laminillas en 2x SSC (buffer) otros 5 minutos a temperatura ambiente.
- f) Se cubrieron las secciones del tejido con 0.5 ml de amortiguador de hibridación y se incubaron nuevamente en una cámara húmeda por un mínimo de 30 minutos a 37° C.
- g) Solamente antes de usarse, se calentó la sonda marcada con digoxigenina por 10 minutos. Se colocó inmediatamente sobre hielo; posteriormente, se mezcló la sonda brevemente y se mantuvo sobre hielo para prevenir la realineación de las cadenas.
- h) Se diluyó la sonda a 40 ng/mL en solución de hibridación y se colocaron 0.5 mL de la solución sobre el tejido.
- i) Para tratar de desnaturalizar las estructuras características de YHV, la laminillas se colocaron sobre baño maría por 6 minutos (la temperatura del portaobjetos alcanzó 95°C). Inmediatamente se colocó el portaobjeto sobre hielo durante 5 minutos.

- j) Se incubaron las laminillas a 42 °C durante 16 horas en una cámara húmeda.
- k) Se lavaron las laminillas de acuerdo al ANEXO 5.
- l) Se preparó un mililitro de amortiguador II (amortiguador de bloqueo) por cada portaobjetos, con la solución de bloqueo a temperatura ambiente antes de utilizarse. Se colocó en cada portaobjetos 0.5 mL de solución de bloqueo sobre las secciones de tejido y se incubaron por 15 minutos a 37 °C.
- m) Se realizó una dilución fresca (1:1000) del anti-DIG fosfatasa alcalina en el amortiguador II (0.25µL antiDIG-FA/500µL de amortiguador II). Se colocó en cada portaobjetos 0.5 mL del anti-DIG/FA diluido y se incubó de 30-45 minutos a 37 °C, en una cámara húmeda.
- n) Se lavaron los portaobjetos en amortiguador I, durante 5 minutos a temperatura ambiente, dos veces.
- o) Se equilibraron los portaobjetos en amortiguador III por 5 minutos a temperatura ambiente.
- p) Se preparó la solución de desarrollo antes de iniciar este paso (10 µL de NBT/BCIP por cada 500 µL de solución de desarrollo. Se utilizó 0.5 mL de dicha solución por cada portaobjetos y se incubó a temperatura ambiente en la cámara húmeda, en la oscuridad, de dos a tres horas y como máximo doce horas. Se monitoreó la reacción en el control positivo desde la primera hora de incubación por medio de observaciones a 100X de aumento y se observó precipitado oscuro sobre los tejidos adecuados. Se detuvo la reacción cuando fue óptimo el control positivo.
- q) Se detuvo la reacción para lavar los portaobjetos en amortiguador IV por 15 minutos a temperatura ambiente.
- r) Se limpiaron los portaobjetos con agua deionizada.
- s) Se contratiñeron y deshidrataron las preparaciones a temperatura ambiente de acuerdo al ANEXO 6.
- t) Se mantuvieron los portaobjetos en xileno y posteriormente se llevó a cabo el montaje de las preparaciones.
- u) Se examinaron al microscopio las preparaciones bajo campo de luz brillante.

III.7. Extracción de ARN para la detección de YHV por RT-PCR mediante el juego de reactivos IQ2000

El protocolo que se describe a continuación se aplicó primero para los lotes de branquias de camarones agrupados previamente; y posteriormente, de forma individual para los positivos resultantes. Las branquias de camarón se procesaron de la siguiente manera:

- a) Para la extracción de ARN, se colocaron secciones individuales (cortes de 3-5 mm) de branquias en alcohol de los camarones en un tubo de 1.5 mL.
- b) Se añadieron 500 μ L de amortiguador de lisis, incluido en el juego de reactivos y posteriormente se homogeneizó el tejido.
- c) Se agregaron 100 μ L de cloroformo (CHCl_3) y se pasó por vórtex la muestra por 20 segundos. Se mantuvo en reposo a temperatura ambiente por 2 o 3 minutos, después se centrifugó a 12 000 x g por 15 minutos.
- d) Se transfirieron 200 μ L de la fase acuosa a un tubo nuevo de 0.5 mL con 200 μ L de 2-propanol (isopropanol, IPA).
- e) Se agitó brevemente en vórtex y se centrifugó a 12 000 x g por 10 minutos, después se decantó el isopropanol.
- f) Se lavó el precipitado formado con 0.5 ml de etanol al 75%, después se agitó por 5 minutos a 7,500 x g, para recuperar el precipitado de ARN, luego se decantó el etanol y se dejó secar el precipitado.
- g) Posteriormente se disolvió el precipitado con agua DEPC.

III.7.1. Protocolo de amplificación de ARN.

Para la amplificación de las muestras de *P. vannamei*, se utilizó un termociclador modelo PTC-200 de MJ Research. Las siguientes condiciones se aplicaron a tubos de pared delgada de 0.2 mL, según las instrucciones del fabricante, IQ2000.

Preparación de reactivos:

- a. Reacción RT-PCR: 8 μ L/reacción

Reactivos RT-PCR premezclados	7.0 μ L
2 unidades/ μ l de la IQenzima ADN Polimerasa	0.5 μ L
Mezcla de la enzima transcriptasa reversa (RT)	0.5 μ L
- b. Reacción de PCR anidado: 15 μ L/reacción

Reactivos premezclado de PCR anidado	14 μ L
--------------------------------------	------------

2 unidades / μ L de la IQenzima ADN Polimerasa 1 μ L

Condición de reacción:

a. Perfil de reacción de RT-PCR.

42 °C durante 30 minutos (transcripción); 94 °C por 2 minutos (previo); luego 94 °C por 20 segundos (desnaturalización); 64 °C por 20 seg. (Alineación); 72 °C por 30 segundos (extensión); repetir 15 ciclos, después terminar 72 °C por 30 segundos; 20 °C por 30 segundos al terminar el ciclo final.

b. Perfil del PCR anidado.

94 °C por 20 segundos (desnaturalización); 62 °C por 20 segundos (alineación); 72 °C por 30 segundos (extensión); repetir 30 ciclos y terminar con 72 °C por 30 segundos; 20 °C por 30 segundos al término del ciclo final.

III.7.1.2. Procedimiento para la reacción de retrotranscripción y amplificación de ARN.

- a) Se pipetearon 8 μ L de reactivo de RT-PCR dentro de cada tubo de reacción de 0.2 mL con su respectiva etiqueta.
- b) Se añadieron 2 μ L de la muestra sin diluir de ARN extraído en cada mezcla de reacción.
- c) Posteriormente se llevó a cabo la reacción RT-PCR.
- d) Se agregó 15 μ L del reactivo de PCR anidado a cada tubo
- e) Se realizó enseguida la reacción de PCR anidado.
- f) Antes de realizar la electroforesis se le añadieron 5 μ L de colorante 6X a cada tubo de reacción y se mezcló bien.
- g) Después de mezclar, la muestra quedó lista para la electroforesis.

III.8. Electroforesis e interpretación.

Para el proceso de electroforesis, las muestras se colocaron en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio incluido. Todas las muestras pasadas por el termociclador se colocaron en los carriles de los geles. Los productos de las corridas se obtuvieron aproximadamente en una hora. Estos fueron observados y fotografiados para su

interpretación por el patrón de bandeo; Se utilizaron los controles positivos a YHV incluidos en el kit IQ2000.

La interpretación ó diagnóstico se basó en el bandeo, proporcionado para el juego de reactivos IQ2000 que ofrece una medida estándar de comparación para diferentes grados de severidad para YHV y GAV (Figura 2).

III. 9. Análisis de datos.

Se realizó un análisis de varianza con los conteos de células infectadas de acuerdo con las salinidades experimentales. La electroforesis se corrió en todas las muestras, se interpretaron y se compararon mediante este análisis de acuerdo con los tiempos de detección de los camarones infectados y no infectados.

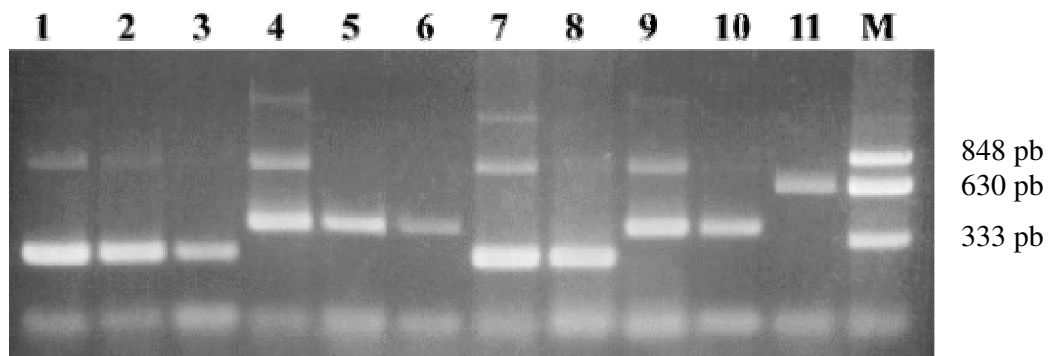


Figura 2. Patrón de bandeo en gel proporcionado por el juego de reactivos IQ2000, para propósitos de comparación de muestras problema a analizar con diferentes grados de infección de YHV y GAV. Carriles 1, 2 y 3: estándares positivos para YHV; Carriles 4, 5 y 6: estándares positivos para GAV.

Carril 1: Estándar positivo de YHV, 2000 copias/reacción.

Carril 2: Estándar positivo de YHV, 200 copias/reacción.

Carril 3: Estándar positivo de YHV, 20 copias/reacción.

Carril 4: Estándar positivo de GAV, 2000 copias/reacción.

Carril 5: Estándar positivo de GAV, 200 copias/reacción.

Carril 6: Estándar positivo de GAV, 20 copias/reacción.

Carril 7: Muestra con infección severa de YHV.

Carril 8: Muestra de infección leve de YHV.

Carril 9: Muestra de infección severa de GAV.

Carril 10: Muestra de infección leve de GAV.

Carril 11: Muestra negativa de YHV/GAV.

Carril 12: Marcador de peso molecular, 848, 630 y 333 pb.

IV. RESULTADOS.

IV.1. Observación de células infectadas.

De acuerdo con el conteo de células infectadas en el curso del experimento, se observó que a medida que el tiempo transcurrió, el patrón general de daño fue en aumento, independientemente de la salinidad tanto en branquias como órgano linfoide de los camarones (Figs. 3 y 4). Con relación a la cantidad de células infectadas por salinidad y por camarones muertos del experimento testigo con YHV, los resultados indicaron que a 5 psu, la máxima cantidad de células infectadas fue de 25/30 a las 119 horas (Fig. 5)

El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) (Conover, 1971) a 5 psu demostró que no hubo diferencias significativas entre el número de células infectadas por campo al microscopio en branquias y órgano linfoide a los diferentes tiempos de análisis a 24, 48, 72, 96 y 120 horas post infección (hpi), ni entre las replicas de los acuarios (KW= 0.84, P=0.97). Por lo tanto, la infección de los organismos entre los cuatro tratamientos se dió de la misma manera, para los diferentes tiempos de muestreo (Figs. 5 y 6). De igual forma, no se observaron diferencias significativas de la infección experimentada entre los organismos de las réplicas de cada tratamiento (P>0.05).

De acuerdo con el curso de la infección natural de YHV, el conteo de células infectadas de camarones moribundos no fue diferente para cada salinidad en los órganos blanco, branquias y órgano linfoide (Figs. 5 y 6). Sin embargo de acuerdo con el tiempo transcurrido, se observó que la máxima infección del 90% se dio en menor tiempo a 5 y 40 psu, seguida de 15 y 25 psu (Fig. 7). Nótese que a 25 psu, el porcentaje de células infectadas fue constante al 60% a partir de las 119 h hasta las 542 horas donde terminó el experimento.

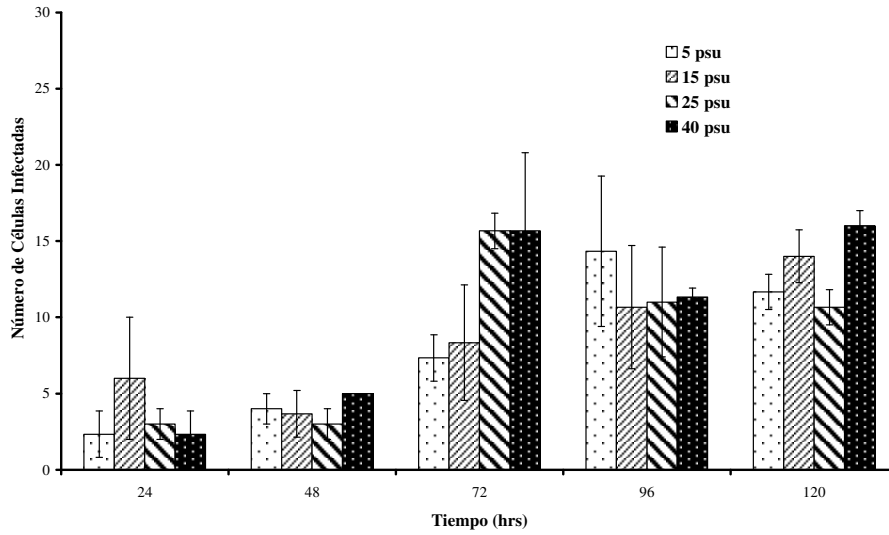


Figura 3. Promedio y desviación estándar del número de células infectadas de 30 observadas en branquias de camarón infectado por YHV a salinidades de 5, 15, 25 y 40 psu.

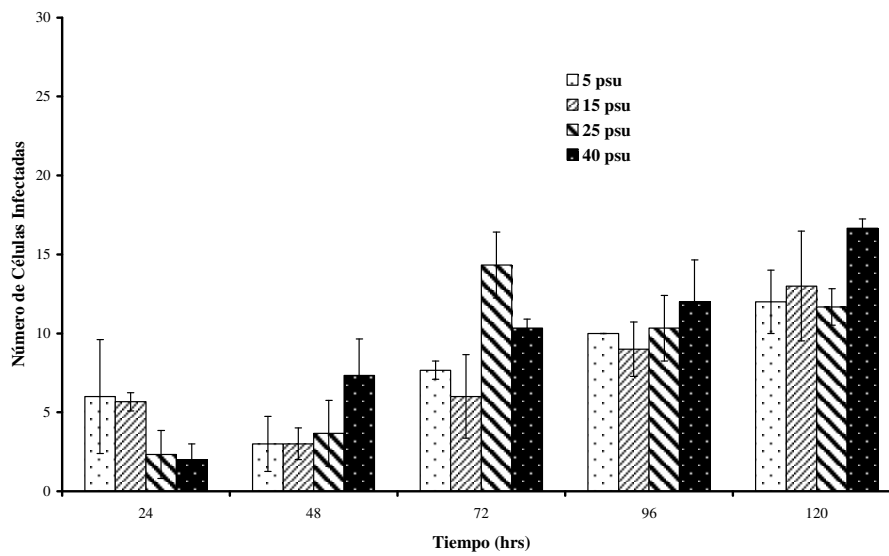


Figura 4. Promedio y desviación estándar del número de células infectadas de 30 observadas en órgano linfoide de camarón infectado por YHV a salinidades probadas de 5, 15, 25 y 40 psu.

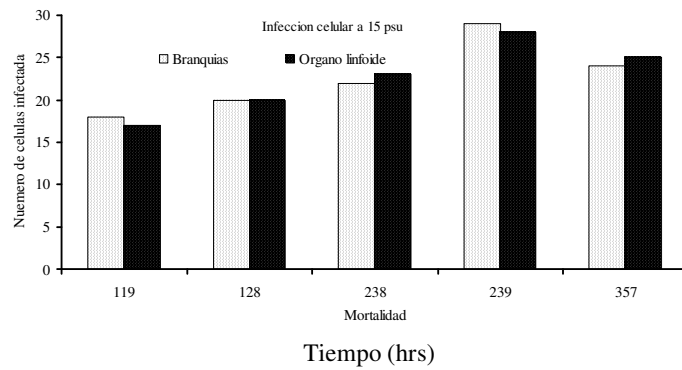
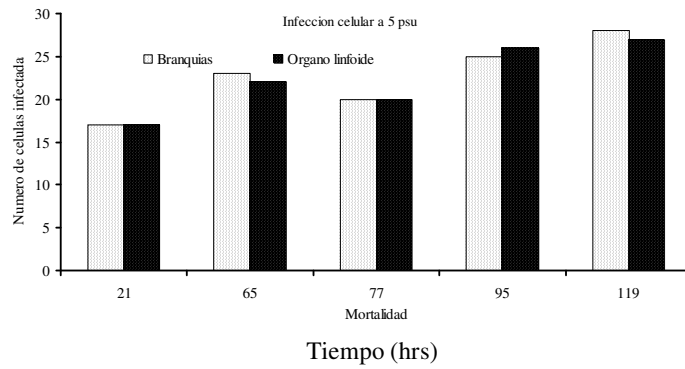


Figura 5. Conteo de las células infectadas en los camarones individuales que fueron muriendo en el experimento control con YHV a 5 y 15 psu.

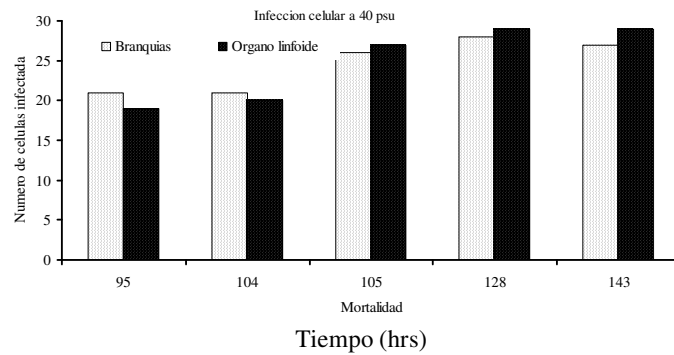
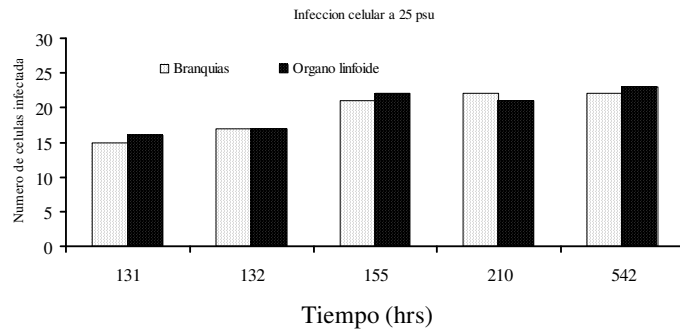


Figura 6. Número de las células infectadas en los camarones individuales que fueron muriendo en el experimento control con YHV a 25 y 40 psu.

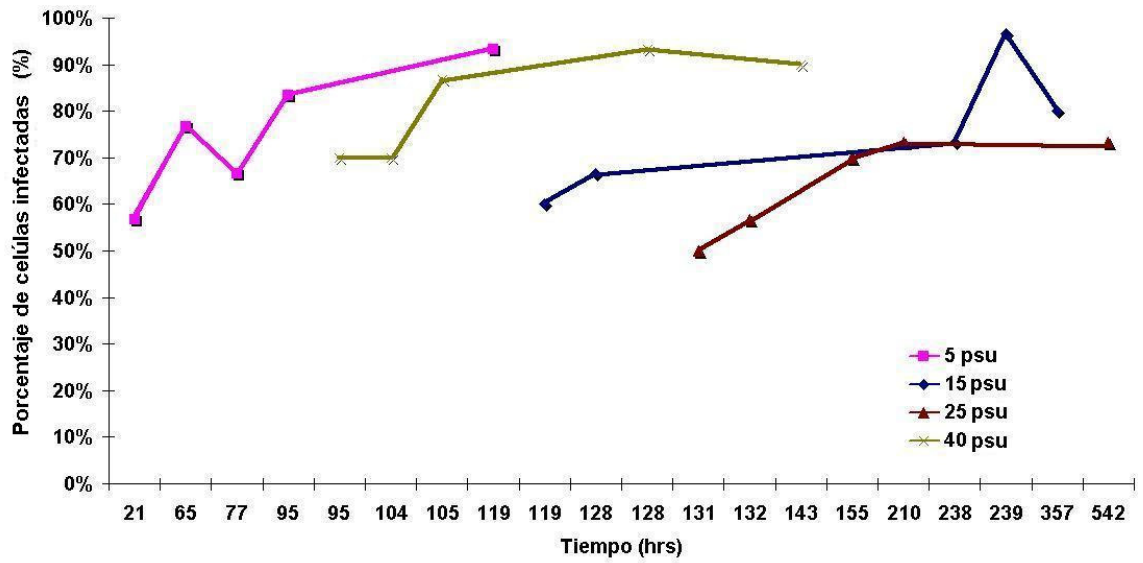


Figura 7. Porcentaje de infección celular a 28 °C durante el tiempo de experimentación del virus YHV sobre *P. vannamei* a las diferentes salinidades, 5, 15, 25 y 40 psu en controles positivos con camarones moribundos.

Con relación al seguimiento del curso de la infección (acuarios del control positivo) en las diferentes salinidades, se observó que los camarones sometidos a 5 y 40 psu murieron drásticamente, para registrarse el último organismo moribundo en ambas salinidades en un tiempo de 119 y 143 horas, respectivamente (Fig. 8). Por otro lado, las salinidades de mayor soporte en la supervivencia de los camarones fueron las de 15 y 25 psu con tiempos de 357 y 542 horas, respectivamente.

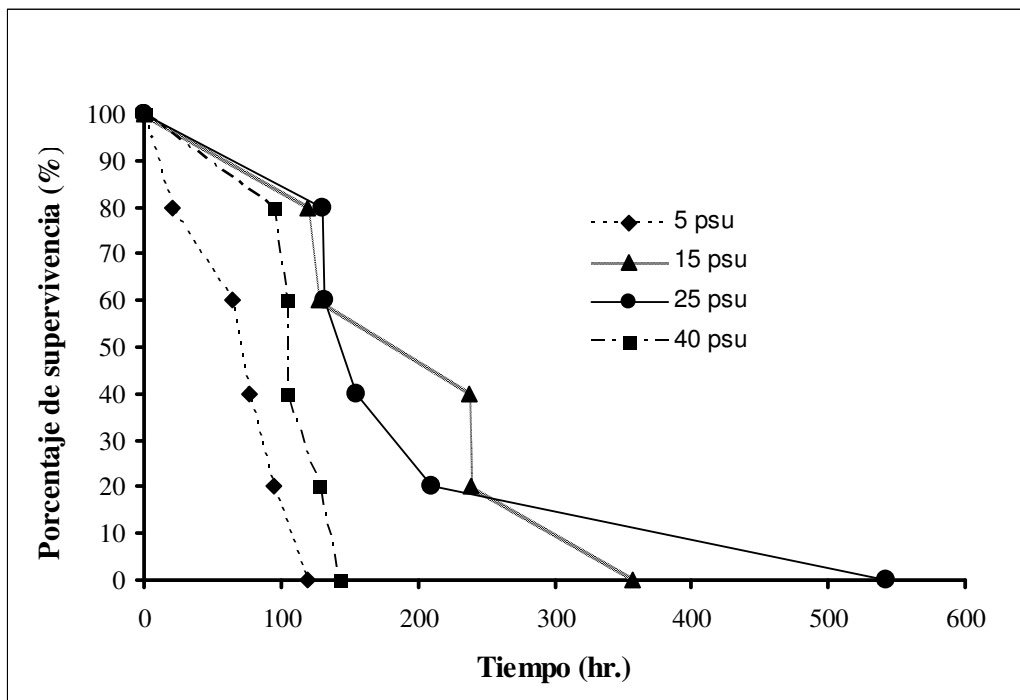


Figura. 8. Supervivencia en acuarios controles positivos, causada por la infección del virus de la cabeza amarilla sobre *P. vannamei* a 28 °C. Cada punto representa a un camarón moribundo. (N = 20).

IV.2. Histopatología e Hibridación *in situ*.

Mediante la observación de los tejidos infectados con la técnica H&E se detectaron alteraciones típicas de infección viral causada por YHV tanto en las branquias como en el órgano linfoide a las diferentes salinidades experimentadas por *P. vannamei*. El análisis histopatológico empleado para observar el daño celular demostró la presencia de núcleos picnóticos y carioréxicos (Fig. 9A) los cuales fueron positivos para órgano linfoide al virus de la cabeza amarilla por Hibridación *in situ* (Figura 9B).

Así mismo las lesiones típicas citadas arriba se observaron en branquias mediante la técnica H&E y la reacción de hibridación *in situ* llevada a cabo en organismos infectados por YHV resultó positiva, lo cual demostró la presencia de dicho virus en estos tejidos infectados (Figura 10).

La técnica de hibridación *in situ* corroboró la presencia del virus en los tejidos y órganos blancos analizados por histopatología, principalmente en órgano linfoide y branquias. Detectando el ARN viral de YHV con una sonda específica para YHV marcada con digoxigenina (Dig), la reacción positiva de dicha sonda se limitó a tejidos infectados y no tuvo reacción en tejidos sanos.

IV.3. Análisis de RT-PCR

Con respecto a los controles positivos, en los camarones se detectó la banda de 277 pb correspondiente a YHV; con 277 y 777 para los severos positivos de acuerdo al juego de reactivos de IQ2000 con marcador de peso molecular de 333 pb, 630 pb y 848 pb (Fig. 11). Un control negativo fue positivo probablemente debido a alguna contaminación de la muestra. El análisis resultante realizado a través de las branquias demostró que solamente YHV estuvo en la infección y que de acuerdo con los patrones de bandeado de las electroforesis, el virus de GAV no presentó la banda típica de 406 pb.

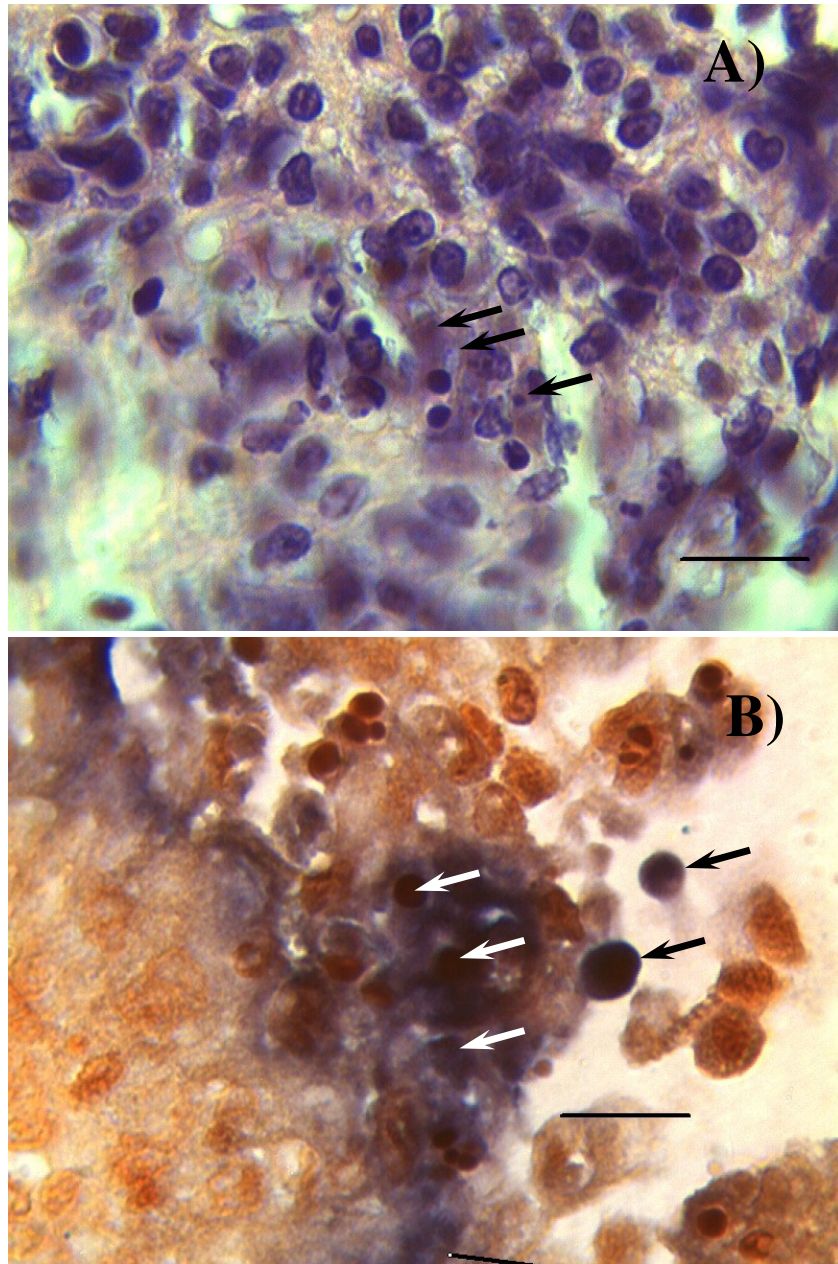


Figura 9. A) Corte histológico a 5 µm de órgano linfoide de *P. vannamei* con evidente picnosis y cariorresis celular (señalado con flechas) e infectado por el virus de la cabeza amarilla (YHV), mediante la técnica H&E. B) Hibridación *in situ* en órgano linfoide de *P. vannamei* donde se observan (flechas) las células positivas al virus de YHV. Camarón infectado a 40 psu. Barra 10 µm.

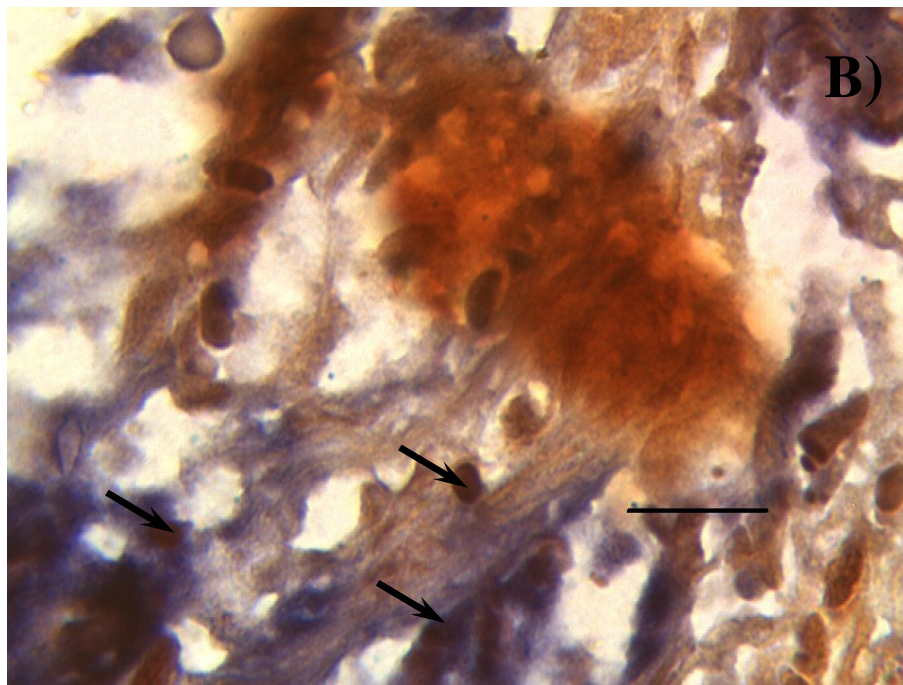
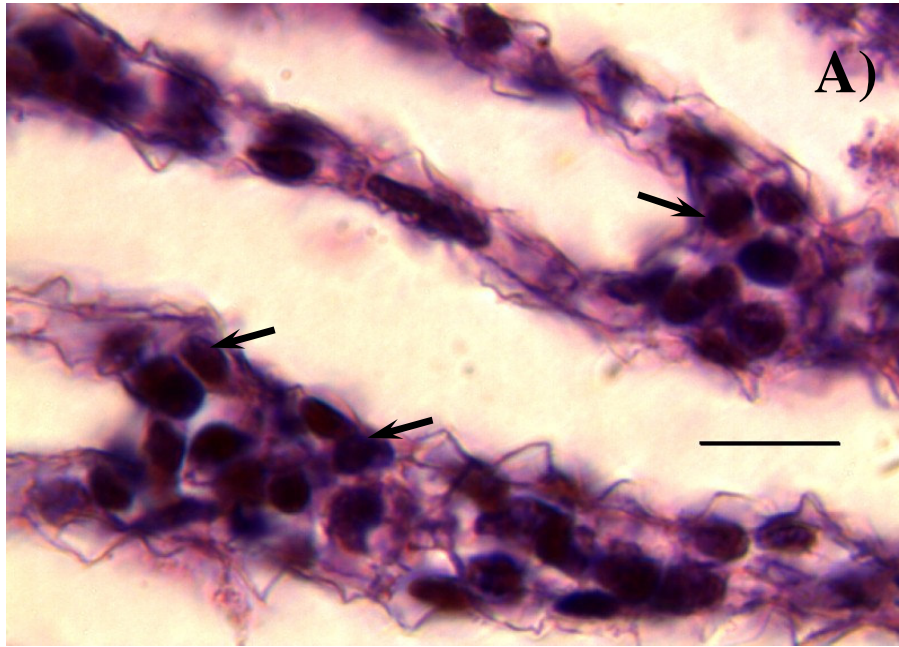


Figura 10. A) Corte histológico de branquias a 5 μm de camarón infectado, que demuestra picnosis y cariorresis nuclear (flechas). Técnica H&E. B): Hibridación *in situ* positiva donde se observa la reacción de la sonda específica en la detección del virus de la cabeza amarilla YHV, camarón infectado a 15 psu.

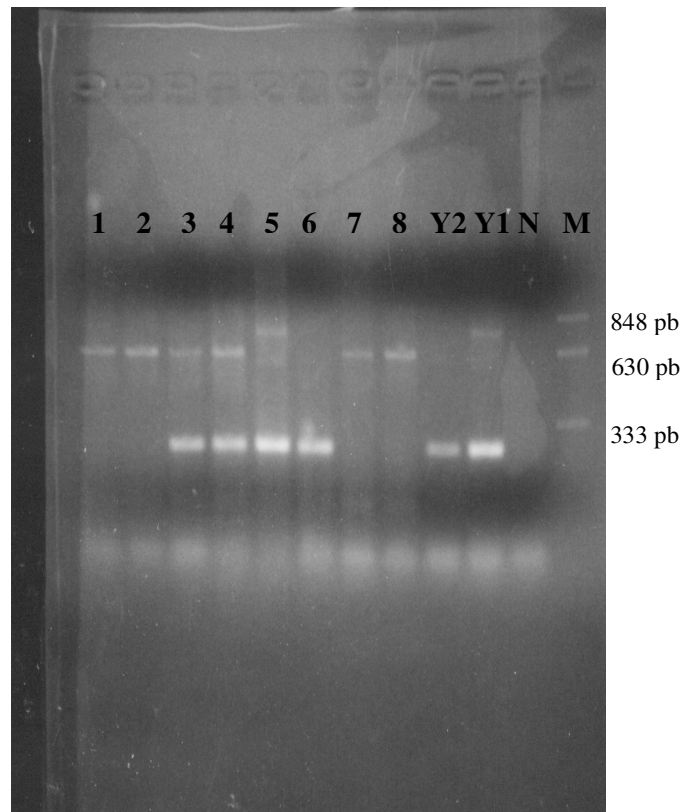


Figura 11. Ejemplo de electroforesis que muestra el análisis de RT-PCR de la infección viral experimentada por *P. vannamei* a 5 psu. En la parte superior se observan las muestras en los carriles 1: camarón control infectado a 21 hpi con resultado negativo. Carril 2 de 24 hpi con resultado negativo a YHV. Los carriles 3-5: 48, 72 y 96 hpi son severos a YHV; el carril 6 a 120 hpi muestra un resultado positivo ligero a YHV; el carril 7 a 24 hpi fue negativo a YHV. Por ultimo el carril 8 de 24 hpi fue negativo a YHV. Y2= control positivo de YHV con 200 copias de reacción; Y1= control positivo a YHV con 2000 copias de reacción; N=control negativo a YHV; M = Marcador de peso molecular de 848 bp, 630 bp y 333 bp.

De acuerdo con el patrón de bandeo proporcionado por el juego de reactivos los camarones infectados a las diferentes salinidades fueron positivos a YHV después de las 24 hpi (Tabla I). A la salinidad de 5 psu, los camarones de *P. vannamei* expuestos a la infección experimental del virus YHV no fueron positivos (ND) a las 24 hpi, pero a partir de las 96 hpi se detectaron todos los camarones positivos y presentaron en conjunto una severidad del 40%. El porcentaje de infección en este tratamiento fue de 66 %. En los camarones del control negativo, no se detectó YHV, con excepción de un positivo registrado a las 120 hpi debido a la contaminación de la muestra.

Al igual que a 5 psu, la salinidad mantenida a 15 psu indicó que los camarones fueron negativos a YHV a las 24 hpi y a las 120 hpi todos fueron positivos. Los camarones severamente infectados demostraron el 13% y su porcentaje de infección del 60% (Tabla I). La infección a las 25 psu demostró niveles bajos de infección a las 24 hpi sin haber encontrado camarones severamente infectados (0%), el porcentaje de infección fue del 53%. A partir de las 96 hpi, todos los camarones fueron positivos. A las 40 psu el virus no fue detectado a las 24 hpi y desde las 48 hpi todos los organismos estuvieron infectados, en 40 psu la severidad fue del 27% y porcentaje de infección fue de los más altos 73% (Tabla I).

Los resultados del seguimiento de la infección en *P. vannamei*, en el control positivo demostraron que en los cuatro diferentes tratamientos, se expresó mayor nivel de virulencia en salinidades extremas de 5 y 40 psu (Tabla II). El nivel de virulencia se reflejó en los tiempos en que se vieron afectados, para 5 psu todos los camarones murieron a los 4.96 días y a 40 psu todos los camarones murieron a los 5.96 días. Mientras que a las otras salinidades duraron más días vivos, a 15 psu todos murieron a los 14.88 días y a 25 psu el último camarón murió a los 22.58 días (Tabla II).

La infección control de YHV señaló que de los cinco camarones sujetos a 5 psu, el primer organismo moribundo se presentó a las 21 horas, mismo que no fue detectado positivo a YHV, el resto de los camarones demostraron los signos de muerte en menos de cuatro días y todos fueron positivos (Tabla II).

Tabla I. Compilación de resultados del análisis de RT-PCR con IQ2000 a partir de los patrones de bandeo de las electroforesis en branquias de *P. vannamei* sobre la infección experimental del virus de la cabeza amarilla (YHV). (+) Camarón con detección positiva ligera a YHV; (*+) camarón con detección positiva severa a YHV; (ND) No detectado en la electroforesis. Los datos son producto de la interpretación del bandeo en las electroforesis para cada camarón.

Tratamiento	Hora de Muestreo	Acuarios			Grupo Control (-)	Camarones severamente infectados	Porcentaje de infección
		1	2	3			
5 psu	24	ND	ND	ND	ND	6/15 = 40 %	10/15 = 66 %
	48	(*+)	ND	(*+)	ND		
	72	(*+)	ND	(*+)	ND		
	96	(*+)	(*+)	(+)	ND		
	120	(+)	(+)	(+)	(+)		
15 psu	24	ND	ND	ND	ND	2/15 = 13 %	9/15 = 60 %
	48	(*+)	ND	ND	ND		
	72	(*+)	(+)	(+)	ND		
	96	ND	(+)	(+)	ND		
	120	(+)	(+)	(+)	ND		
25 psu	24	ND	ND	ND	ND	0/15 = 0%	8/15 = 53 %
	48	(+)	ND	ND	ND		
	72	ND	(+)	ND	ND		
	96	(+)	(+)	(+)	ND		
	120	(+)	(+)	(+)	ND		
40 psu	24	ND	ND	ND	ND	4/15 = 27 %	11/15 = 73 %
	48	(*+)	(+)	(+)	ND		
	72	(+)	(*+)	ND	ND		
	96	(+)	(*+)	(+)	ND		
	120	(+)	(+)	(+)	ND		

Total de organismos analizados: 80

Tabla II. Análisis individual de RT-PCR (grado de infección) por el juego de reactivos de IQ2000 en camarones moribundos al tiempo (t) en horas, h, y días (entre paréntesis) del curso de la infección en los acuarios del control positivo. Se demuestra el curso de la infección por YHV diferentes salinidades. * =infección severa. +=infección ligera

T R A T A M I E N T O S							
5 psu		15 psu		25 psu		40 psu	
(t)	RT-PCR	(t)	RT-PCR	(t)	RT-PCR	(t)	RT-PCR
21 h (0.88)	ND	119 h (4.96)	(+)	131 h (5.46)	(*+)	95 h (3.96)	(+)
65 h (2.71)	(+)	128 h (5.33)	(+)	132 h (5.50)	(+)	104 h (4.33)	ND
77 h (3.21)	(+)	238 h (9.92)	ND	155 h (6.46)	(*+)	105 h (4.38)	(+)
95 h (3.96)	(+)	239 h (9.96)	(+)	210 h (8.75)	(+)	128 h (5.33)	(*+)
119h (4.96)	ND	357 h (14.88)	ND	542 h (22.58)	(+)	143 h (5.96)	ND

A la salinidad de 15 psu, el primer camarón que resultó moribundo fue a los cinco días y el último fue a los 14.88 días, aunque resultó negativo a YHV. En este tratamiento también hubo otro camarón en el que no fue detectado el virus y fue a los 9.92 días. Por su parte a 25 psu, el primer camarón moribundo fue a los 5.46 días y el último a los 22.58 días. Para este tratamiento, todos fueron positivos a YHV. A 40 psu, el primer camarón que resultó afectado fue a los 3.96 días y el último a los 5.95 días. También, hubo resultados no detectados a YHV en dos camarones a 4.33 y 5.96 días (Tabla II).

En el presente estudio, los camarones positivos a YHV que soportaron un menor tiempo de exposición al virus fueron aquellos mantenidos en 5 psu, oscilando la mortalidad entre las 21 y 119 hpi, (máximo 4.96 días) entre el primer y último organismo (Tabla II).

Posteriormente el tratamiento que mostró un comportamiento infectivo similar a 5 psu fue el de 40 psu, lo que evidenció poca resistencia a la infección experimental, con el registro del primer camarón muerto a las 95 hpi, en el tratamiento a esta salinidad el número de camarones disminuyó rápidamente, donde el último murió a 143 hpi, o 5.96 días (Tabla II).

Los tratamientos con salinidades dentro o cercanas al condiciones isosmóticas óptimas de 15 y 25 psu, resultaron ser los mejores en cuanto a supervivencia por la

exposición al virus de YHV; a 15 psu el primer camarón muerto se encontró a las 119 hpi, seguido del segundo, a las 128 hpi. Cabe señalar que a los 9.92 días no se detectó el virus en el tercer camarón moribundo. Se registró el último camarón moribundo a los 14.88 días.

En el tratamiento de 25 psu, se registró el primer organismo muerto a las 131 hpi y esta salinidad fue la que demostró más soporte a la infección con YHV porque el tiempo de duración de camarones vivos bajo la exposición viral fue hasta los 22.58 días. En resumen, el mayor efecto de la salinidad en combinación con la presencia del virus YHV, ocurrió a 5 psu. El tiempo en que se terminó el experimento, fue de 3.96 días, debido a que fue cuando murió el último camarón. Después de los 5 psu, es notorio que la salinidad de 40 psu quedó en segundo lugar y demostró el efecto al YHV. El último organismo murió a los 5.96 días. Por el contrario, las salinidades en donde se mostró un menor efecto del virus sobre el camarón y en comparación con 5 y 40 psu, fueron las de 15 y 25 psu, donde registraron 14.88 y 22.58 días, respectivamente, como máximo tiempo para que ocurriera la muerte de los camarones.

V. DISCUSIONES.

El despunte de la camaronicultura en México se dio con el cultivo de camarón azul entre los 80's y 90's. Sin embargo, debido a las grandes epizootias en las especies provocadas por IHNV a finales de los 80's, por lo cual los productores decidieron cultivar una especie más resistente como lo es camarón blanco (Ruiz-Luna y Berlanga-Robles, 2002), especie que actualmente es el eje de la acuicultura en la región noroeste del país. Aunque la producción camaronícola en México en sus inicios fue sustentada principalmente en el camarón azul, ahora es el camarón blanco la especie principal de cultivo.

En México se cree que la introducción y la dispersión de los virus exóticos probablemente sea debida a la falta de tratamiento del agua que se utiliza en el reprocesamiento de camarón importado y la importación de organismos vivos de cultivo (De la Rosa-Vélez *et al.*, 2006). Sin embargo nada se ha demostrado con respecto al origen del virus de la cabeza amarilla en granjas mexicanas a pesar de que este experimento haya sido realizado con el virus de YHV de granjas de la región noroeste de México.

El virus de la cabeza amarilla ha causado severos daños en la industria del cultivo de camarón en el sureste de Asia y países del Indo-Pacífico, principalmente, Tailandia (Flegel, 1997; Lightner, *et al.*, 1997; Hasson, *et al.*, 1997; Flegel, 2006). *Penaeus monodon* ha sido la principal especie afectada (Flegel, 1997; Flegel, 2007), aunque YHV puede también causar enfermedad en las especies de camarones de importancia comercial como *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* (Lu *et al.*, 1994; Lightner *et al.*, 1998). En este estudio *P. vannamei* ha resultado infectado en todas las salinidades a las que fue sometido.

Los pocos trabajos realizados sobre el estudio de los agentes virales en México están encaminados principalmente a las granjas de camarón y desafortunadamente en algunos casos es difícil acceder a la información que se genera mediante los diagnósticos no publicados. Dentro de los pocos trabajos publicados, De la Rosa-Velez *et al.*, (2006) detectaron presuntivamente el virus de la cabeza amarilla a través de RT-PCR en granjas de las costas del noroeste Mexicano.

En este estudio donde se demuestra el efecto sinérgico entre la salinidad y infección viral se observó que causa mortalidad rápida en salinidades extremas. También es necesario destacar que este experimento ofrece las primeras pruebas con

inóculos virales de YHV localizado en granjas del noroeste Mexicano, donde se incorporó un factor importantísimo como la salinidad.

Esta infección experimental con virus de la cabeza amarilla, demostró bajo condiciones controladas de diferentes salinidades, mortalidades a diferentes horas post infección por dicho virus. En estudios previos (De la Rosa -Vélez, *et al.*, 2006) se señala que YHV no mostró alta virulencia en granjas muestreadas del noroeste Mexicano. Así mismo, se sugiere que tal vez existen por lo menos tres diferentes genotipos del complejo virus de la cabeza amarilla. Esta hipótesis conduciría a probar la existencia de dichas variantes mediante pruebas moleculares.

La presencia en granjas de México, con baja virulencia o la posible existencia de alguna resistencia ambiental de los organismos cultivados, pueden ser posibles en concordancia con los resultados aquí expuestos. En este estudio, la virulencia fue mayor en salinidades extremas (5 y 40 psu) que en el tratamiento isosmótico óptimo de 25 psu. La infección a 15 psu fue menor que 5 y 40 psu, lo que indica que la cercanía a condiciones óptimas isosmóticas del camarón, disminuyó la virulencia dentro de este tratamiento.

Mediante estos experimentos ha quedado claro que en las salinidades extremas los camarones soportaron menos la invasión viral, ya que existió una diferencia de 443 horas más a 25 psu comparado con 5 psu. Una diferencia similar de 399 h se observó en 25 psu comparada con 40 psu. Es importante destacar que de acuerdo con la salinidad ideal de 15 a 25 psu para juveniles de *P. vannamei*, los organismos presentan mayor crecimiento comparado con menores salinidades, de 15 hasta 5 psu (Boyd y Watten, 1989).

También, Boyd y Watten (1989) señalan que la supervivencia no se ve afectada por salinidades menores, lo que indica la capacidad de osmorregulación del camarón. Sin embargo, la presencia mortal del virus de YHV, en los camarones de este experimento afectó considerablemente la supervivencia al aumentar su grado infectividad. En este sentido es importante señalar que el efecto combinado entre la energía gastada en procesos de osmorregulación y la destrucción celular causada por el virus constituyen elementos mortales que *P. vannamei* tuvo que soportar al morir en menos de seis días a salinidades extremas.

En este estudio, se observó mayor severidad en condiciones extremas de salinidad lo cual afectó la respuesta del camarón a la invasión viral provocando

mortalidades en la población experimental en menor tiempo que en condiciones osmóticas ideales (25 psu) lo que pudo proporcionar mayor resistencia al virus de YHV.

Durand *et al.* (2000) encontraron mortalidades del 100 % en *P. vannamei* con seis días post infección con YHV en organismos de ocho gramos; mientras que, en el presente estudio se presentó el 100 % de mortalidad en camarones de 18.28 g al final de seis días, lo que coincide en tiempo en las salinidades extremas. No se sabe si pueda existir diferencia en la susceptibilidad a la virulencia con respecto al peso y talla. En el presente estudio si se apunta a las diferencias con respecto a la condición fisiológica de los camarones por la osmorregulación de que son objeto al estar fuera de las condiciones óptimas osmóticas a salinidades de 5 y 40 psu.

Carvajal-Sánchez (2005) realizó un estudio experimental con el virus del Síndrome de la mancha blanca, WSSV, a diferentes salinidades en juveniles de camarón blanco. El autor concluyó que aparentemente la salinidad no actuó en sinergia con WSSV, por lo que, las condiciones de salinidad no influyeron en los procesos de desarrollo de la infección viral. Dicho de esta manera para el trabajo aquí realizado con YHV se observó que las salinidades demostraron porcentajes de infección muy similares entre si lo que conduciría a una conclusión similar a la de Carvajal-Sánchez (2005). No obstante, en el citado estudio no hubo valoración de la severidad del virus en los camarones, a diferencia con YHV, donde se demostró que los organismos sí presentaron una sinergia entre la virulencia y la salinidad.

En un estudio de Laria-Lamela *et al.* (2005) se reporta la disminución del sistema de la profenoloxidasa en condiciones de 8 psu comparado con 35 y 18 psu, lo que demuestra que la salinidad afecta algunos sistemas de respuesta del camarón. Por otro lado en este estudio, los niveles de mayor virulencia de YHV se encontraron en salinidades extremas de 5 y 40 psu; lo que también demuestra que existe un efecto a 5 psu donde la mortalidad registrada fue la mayor y en menor tiempo. Aunque no existen estudios previos que reporten una influencia directa de la salinidad sobre la resistencia de los camarones, en la presente investigación sí se observó mayor resistencia a 25 psu ya que los organismos expuestos al virus vivieron mayor tiempo y no se encontraron severamente infectados.

El protocolo para el diagnóstico a través de RT-PCR ha sido desarrollado para la detección de YHV (Wongteerasupaya *et al.*, 1997; Cowley *et al.*, 1999) y está probada su alta sensibilidad en la detección de dicho virus del virus del GAV. Sin embargo, independientemente del virus a detectar, las muestras deben de ser procesadas

rápidamente debido a la inestabilidad del virus de RNA. Una alternativa para las muestras de RNA puede ser el almacenar el extracto de RNA en una variedad de reactivos comerciales o preservarlas en alcohol al 95–100 %. Estos métodos alternativos pueden ser utilizados por un periodo corto de almacenaje, durante pocos días o semanas, especialmente a temperatura ambiente.

Cabe señalar que durante este estudio se llevó a cabo la colecta de muestras de branquias en alcohol absoluto (100 %) para su posterior análisis mediante RT-PCR, pero el periodo de almacenaje fue mayor al contemplado inicialmente lo que pudo afectar la integridad genómica del virus. Es por esto que aquellos camarones que salieron negativos al virus, el tiempo de almacenaje pudo haber afectado. También se observó que a través de este método de análisis el YHV a 48 hpi puede ser fácilmente detectado con un grado de confiabilidad aceptable. Esto puede ser de utilidad para tomar las medidas correspondientes que le competen al sector productivo para evitar mayores mortalidades dentro del ciclo de cultivo.

Hasson *et al.* (1997), mencionan que existe una inquietud común al momento de examinar las muestras por hibridación *in situ*; ya que la fijación excesiva con solución Davidson puede ocasionar la destrucción de los virus de RNA, tales como el YHV. Sin embargo, durante este estudio se utilizó solución Davidson “amigable” y las muestras se analizaron inmediatamente a través de histología e hibridación *in situ* sin ningún problema.

En México se desconoce el grado de prevalencia de YHV y su nivel de virulencia, así como el efecto negativo en los cultivos comerciales. En países asiáticos, tales como Tailandia, ha causado grandes pérdidas económicas (Chantanachookin *et al.*, 1993). Esto se agrava cuando existe otro virus como el síndrome de la mancha blanca, WSSV donde actúa la mayoría de las veces en sinergia con otros virus, tales como YHV.

Aunque en México YHV se ha detectado presuntivamente en granjas del noroeste, el efecto infeccioso no ha sido demostrado como para ser un factor limitante en el desarrollo y éxito del cultivo del camarón blanco. Sin embargo, con lo aquí demostrado probablemente exista una cierta resistencia de *P. vannamei* a condiciones de cultivo, ó a la presencia de una cepa viral menos infecciosa que la encontrada en los países asiáticos (De la Rosa *et al.*, 2006) lo cual quedaría por demostrar. Sin embargo, en este trabajo y bajo las condiciones experimentales realizadas con YHV, se pudo demostrar su alta virulencia en camarones adultos.

Las granjas camaronícolas del sur de Sonora y Sinaloa tienen como principal fuente de abastecimiento de agua a las lagunas costeras adyacentes, donde las variaciones de salinidad son generalmente drásticas, lo cual podría ser detonante de la virulencia al encontrarse YHV. También los cultivos de camarón en agua dulce desarrollados en ciertas zonas del Pacífico Mexicano podrían brindar las condiciones óptimas para la aparición y desarrollo viral de YHV. El estado de Colima es caracterizado por cultivar camarones en agua dulce a 5 psu, suministrada mediante pozos artesanales, y estos sistemas de cultivo en agua dulce pueden estar sujetos a probables y severas infecciones por YHV.

Por otra parte, en el estado de Sonora las salinidades bajo las cuales se cultiva el camarón *P. vannamei* son extremas, hasta poco mayores de 40 psu (Velásquez-Sánchez, 2001). No se ha documentado la presencia de YHV en las granjas, aunque sí hay problemas de baja producción, pero atribuidas principalmente a WSSV. En este sentido, los estudios sobre la presencia de YHV en granjas de camarón deben ser cuidadosamente llevados a cabo con todo el rigor del tratamiento de las muestras, incluyendo tamaños adecuados de muestras, mayores de 30 organismos por estanque.

También es importante mencionar que los signos patognomónicos en camarones de *P. vannamei* y *P. stylirostris* son diferentes a los que ha demostrado *P. monodon*, por lo que puede prestarse a confusión de primera instancia en los camarones utilizados de rutina para el diagnóstico. En este estudio en *P. vannamei* y a todas las salinidades no se observó una coloración amarilla típica como la descrita para *P. monodon*, sino más bien fueron camarones muy débilmente amarillentos.

Otro aspecto que es importante mencionar es el análisis sobre tipos de tejidos al momento de la detección de YHV. Por ejemplo, en bioensayos realizados en *P. vannamei* con YHV por Quintero-Arrendondo (2004), se encontró una gran variación en la detección del virus de acuerdo con los órganos analizados. Por lo encontrado en este estudio, mediante el análisis en las branquias por RT-PCR se considera que es uno de los mejores tejidos para la detección del virus.

En este experimento se trabajó con una sola temperatura, sin embargo otras temperaturas son importantes ya que los cuadros ambientales en la región noroeste varían. Este factor debe considerarse en futuras investigaciones ya que en Sonora, estado con una importante producción de camarón en México, las temperaturas de cultivo quedan comprendidas entre los 21-34 °C. Se concluye que la salinidad es un

factor determinante en el disparo de la virulencia de YHV, por lo que los sistemas de salinidades extremas pueden estar sujetos al riesgo de mayores cuadros de ataque con el virus de la cabeza amarilla.

VI. CONCLUSIONES.

1. El experimento realizado en este estudio con muestras de camarones de granjas infectadas, corroboran una vez más la presencia de YHV en el noroeste de México debido a que la correspondencia entre la histología, hibridación *in situ* y el análisis por RT-PCR fueron contundentes.

2. La aplicación de técnicas específicas requiere de la experiencia necesaria para el manejo del equipo y para la interpretación de resultados, lo cual puede quedar bajo la responsabilidad de un técnico en sanidad en las granjas camaroneras.

3. Todos los organismos marinos requieren de condiciones ambientales óptimas para su desarrollo y la variación de estas puede influir sobre la susceptibilidad para adquirir enfermedades. El cultivo de camarones en el noroeste de México, presenta regimenes de salinidad y temperatura variables a lo largo de la costa del Golfo de California, lo que sin duda podría influir en la prevalencia de las enfermedades virales.

4. Los resultados aquí expuestos indican que los extremos de salinidad pueden ser perjudiciales para el camarón en el caso de infección por YHV, ya que esta puede ser más severa que a condiciones más favorables de salinidad para el camarón.

5. La detección temprana de la infección por YHV puede ser un factor muy importante para los productores. Por esta razón, independientemente de la salinidad del cultivo, la detección segura por RT-PCR puede hacerse a las 48 horas después de que el virus haya ingresado a los camarones. Así, el monitoreo constante es un factor clave que puede evitar pérdidas mayores.

6. Es importante puntualizar que a 25 psu se demostró una resistencia evidente a la invasión viral por lo que se concluye que organismos como *P. vannamei* sometidos a salinidades extremas de 5 y 40 psu en combinación con la presencia del virus YHV, pueden causar un efecto muy marcado sobre la supervivencia, comparado con valores de 15 y 25 psu.

VII. RECOMENDACIONES

- Las muestras en alcohol se deben analizar inmediatamente, para evitar que el tiempo prolongado de almacenamiento sea un factor limitante para la detección de YHV a través de RT-PCR.
- Es importante conocer el nivel de virulencia del virus de la cabeza amarilla a diferentes temperaturas, para ello será necesario realizar bioensayos de infectividad.
- Realizar bioensayos de infección de YHV con camarones de peso y talla promedio diferentes, esto para observar si existe relación entre la resistencia a la virulencia del virus y la talla de los organismos en salinidades iguales.
- Monitorear continuamente las poblaciones de camarón en cultivo para detectar a tiempo el virus de YHV, debido a que puede existir infección sinérgica con el virus de la mancha blanca, WSSV.
- Se recomienda el análisis de YHV principalmente en branquias de camarón.
- Se recomienda realizar mayores esfuerzos de monitoreo en granjas con adecuados números de muestras, mayores de 30 organismos por estanque.
- Comunicar al sector productivo la información generada sobre YHV para crear conciencia sanitaria y tomar medidas precautorias.

VIII.-LITERATURA CITADA

- Berlanga-Robles, C.A. y A. Ruiz-Luna. 2002. Land-use mapping and change detection in the coastal zone of northwest Mexico using remote sensing techniques. *Journal of Coastal Research*, 18: 514-522.
- Bonami, J.R. 1997. The crustacean viral diseases: recent developments. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathology*. 17 (6): 1-3.
- Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracon, U. Aekpanithanpong y C. Chantanachookin, 1993. Non occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*28, 103-109
- Boyd, C.E. 1980. Comparisons of water analysis kits. *Proceedings of the Annual Conference of the Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies* 34: 39-48.
- Boyd, C.E. y B.J. Watten. 1989. Aeration systems in aquaculture. *Reviews of Aquatic Science* 1: 425-472.
- Carvajal-Sanchez, I.E. 2005. Infección experimental de juveniles de *L. vannamei* (Boone, 1931) con el Virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) a diferentes salinidades de cultivo. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura de Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. pp: 61
- Chantanachookin, C., S. Boonyaratpalin, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracon, U. Ekpanithanpong, K. Supamataya, S. Sriurairatana y T.W. Flegel. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, 17: 145-157.
- Conover, W.J. 1971. *Practical nonparametric statistics*. John Wiley and Sons. New York, 79 pp.

- Conroy, D.A. y G. Conroy. 1990. Manual de patología de camarones peneidos. Segunda edición. Maracay, Venezuela. 15 pp.
- Cowley, J.A, C.M. Dimmock, C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim y P.J. Walter. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 153-157.
- Cowley, J.A., y P.J Walker, 2002. The complete sequence of gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns indicates a gene organization unique among nidoviruses. *Arch. Virol.*, 147: 1977–1987.
- Dall, W., B.J. Hill, P.C. Rothlisberg, y D. J Staples, 1990. The Biology of Penaeidae, *Advances in Marine Biology* vol. 27. Academic Press, New York, 489 pp.
- De la Rosa- Vélez, J., Y. Cedano-Thomas, J. Cid-Becerra, J. C. Méndez-Payán, C. Vega-Pérez, J. Zambrano-García, y J. R. Bonami, 2006. Presumptive detection of yellow head virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and dot-blot hybridization in *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* cultured on the Northwest coast of Mexico. *Journal of Fish Diseases*, 29: 717-726.
- Durand, S.V., K.F.J. Tang, y D.V. Lightner, 2000. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12: 128-135.
- Flegel, T.W. 1997. Major viral diseases of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 13: 433–442.
- Flegel, T.W. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, 258: 1-33.
- Flegel, T.W. 2007. The right to refuse revision in the genus *Penaeus*. *Aquaculture* 264, 2-8.

- Garza , J.R., K.W Hasson, B.T. Poulos, R.M. Redman, B.L. White, y D.V. Lightner. 1997. Demonstration of infectious Taura Syndrome Virus in the feces of seagulls collected during an epizootic in Texas. *Journal of Aquatic Animal Health*, 9: 156-159.
- Hasson, K.W., J. Hasson, H. Aubert, R. Redman, D.V. Lightner, 1997. A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *Journal of Virological Methods*, 66: 227-236.
- Hendrickx, M.E. 2001. Taxonomía, Biología y Zoogeografía de los penidos de importancia comercial del Pacífico mexicano. En: *Camaronicultura y Medio Ambiente*. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Estación Mazatlán, UNAM, Programa Universitario de Alimentos y el Colegio de Sinaloa. México, D. F. Ed. Federico Paez, pp: 219 .
- Humphrey, J.D. 1995. Australian Quarantine Policies and Practices for Aquatic Animals and Their products: a review for the Scientific Working Party on Aquatic Animal Quarantine. *Bureau of Resource Sciences*, 78: 103-110.
- Jitrapakdee, S., S. Unajak, N. Sittidilokratna, R.A. Hodgson, J.A Cowley, P.J Walker, S. Panyim y V. Boonsaeng, 2003. Identificación and analysis of gp116 and gp64 structural glycoprotein's of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. *J. Gen. Virol.*, 84: 863–873.
- Laria-Lamela, R.E. R Silveira-Coffigny, Y. Cruz-Quintana, M. Martínez, 2005. Phenoloxidase and peroxidase activity in the shrimp *Litopenaeus schmitti*, Pérez-Farfante and Kensley (1997) exposed to low salinity. *Aquaculture Research*, 36: 1293-1297.
- Lightner, D.V., K.W. Hasson, B.L. White y R.M Redman. 1998. Experimental infection of western hemisphere Penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, 10: 271–281.

- Lightner, D.V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostics Procedures for Diseases of Culture Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. 304 p.
- Lotz, J.M. 1997. Special topic review. Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stock in shrimp aquaculture. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 13: 1-9.
- Lu, Y., L.M Tapay, J.A Brock, P.C., Loh. 1994. Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). J. Fish Dis, 17: 649–656.
- Mayo, M.A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. Archives of Virology, 147: 1655-1656.
- Méndez-Payán, J.C. 2003. Presencia y prevalencia de algunos agentes virales en granjas camaronícolas de Nayarit y Sinaloa, evaluadas mediante técnicas de biología molecular. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura de Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. Pp: 45-47.
- Montoya-Rodríguez, L. y S. López-Félix. 2000. Estandarización de técnicas moleculares para la detección de patógenos en organismos acuáticos. pp: 263-279. En: Memorias de III Simposium Internacional de Acuicultura. Mazatlán, Sin. Méx., del 5 al 7 de octubre. 382 pp.
- Páez-Osuna. F. 2001. Camaronicultura y medio ambiente. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Estación Mazatlán, UNAM, Programa Universitario de Alimentos y Colegio de Sinaloa. México, D. F. 519 p.
- Peters, F. y M. Neukirch. 1986. Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. J. Fish Dis., 9: 539-544.

Prophet, E.B. B. Mills, J.B. Arrington y L.H. Sobin, 1992. Laboratory methods in histopathology. Washington, DC. American Registry of Pathology, pp: 53–58.

Quintero-Arredondo, N. 2004. Análisis de camarones silvestres y cultivados de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) y *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874) para la búsqueda del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y virus de la cabeza amarilla (YHV) de la costa de Sinaloa, México. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. 71pp

Pequeux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15: 1-60.

Prieto, A., E. Fajer, R. Silveira y A. Quesada. 1995. Prevención y control de enfermedades en organismos acuáticos cultivados. Manual del curso. Ed. Centro de Investigación Pesquera, ciudad de la Habana, Cuba, pp: 42-47

SAGARPA. 2003. Carta Pesquera.

Schnurrenberger, P.R., R.S. Sharman y G.H Wise, 1987. Attacking animal diseases: Concepts and strategies for control and eradication. Iowa State University, Ames, USA, p. 200.

Sittidilokratna, N.R. A. Hodgson, J.A. Cowley, S. Jitrapakdee, V. Boonsaeng, S. Panyim, y P.J. Walter. 2002. Complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus is an invertebrate nidovirus. *Diseases of Aquatic Organism* 50, 87-93.

Soto, C. 2000. Efecto de un bicultivo de camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*) y ostión japonés (*Crassostrea gigas*) sobre la calidad de agua y sedimento en una laguna de descarga de una granja camaronicola experimental. Tesis de licenciatura. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. México. 108 pp.

- Unzueta-Bustamante, M.L. 2000. Problemas patológicos en camarones peneidos de importancia comercial en las Américas. pp: 207-222. En: Memorias del III Simposium Internacional de Acuicultura. Mazatlán, Sin. Méx., del 5 al 7 de octubre. 382 pp.
- Wang, C.S., K.F.J. Tang, G.H. Kou y S.N. Chen, 1996. Yellow head disease-like infection in Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* cultured in Taiwan. Fish Pathol., 31: 177-182.
- Wongteerasupaya, C., W. Thongchuea, V. Boonsaeng, S. Panyinm, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul y T.W Flegel. 1997. Detection of yellow head virus (YHV) for *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. Dis. Aquat. Org., 31: 181-189.
- Wood, J.M., R.G Webster, Y. Kawaoka, W.J. Bean y V.F. Nettles, 1986. A Lethal Outbreak of H5N2 Influenza in Poultry in the USA: Virus Characterization and Host Range. In: McFerran, J.B., McNulty, M.S. (Eds), Acute Virus Infections of Poultry. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 1-22.
- Zarain-Herzberg, M. y F. Ascencio-Valle. 2001. Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. Aquaculture. 193: 1-9.

IX. ANEXOS

Anexo 1.

La preparación de solución Davidson RNA-amigable para un litro, los componentes son los siguientes:

349 mL	Formaldehído al 37 %
407 mL	Etanol al 95 %
X mL	Agua destilada
pH	6.5 con NaOH conc. (29 %)

Nota: La determinación del pH debe ser realizada utilizando papel pH y no pHímetro ya que el contenido de alcohol del fijador de este aparato impide que se obtenga una lectura precisa del pH.

Anexo 2.

Proceso de deshidratación de tejidos de camarón *Penaeus vannamei*.

Horas	Solución	Cantidad de etanol grado reactivo (mL)	Cantidad de agua destilada (mL)
1	70 % etanol	700	300
1	70 % etanol	700	300
1	80 % etanol	800	200
1	80 % etanol	800	200
1	95 % etanol	950	50
1	95 % etanol	950	50
1	100 % etanol	1000	-
1	100 % etanol	1000	-
1	Xileno I	-	-
1	Xileno II	-	-
1	Parafina de 55-57°C	-	-
1	Parafina de 55-57°C	-	-

Anexo 3.

Proceso de tinción Hematoxilina de Harris y Eosina, empleado para teñir cortes histológicos de camarón. (Lightner, 1996, modificada en este trabajo).

PROCESO DE TINCION HEMATOXILINA-EOSINA		
CAJAS	REACTIVO	TIEMPO
1	Xileno I	5 minutos
2	Xileno II	5 minutos
3	Etanol:Xileno (1:1)	1 minuto
4	Alcohol 100 %	1 minuto
5	Alcohol 100 %	1 minuto
6	Alcohol 95 %	1 minuto
7	Alcohol 95 %	1 minuto
8	Agua corriente	10 minutos
9	Hematoxilina	1-8 minutos
10	Agua corriente	20 minutos
11	Alcohol ácido	10 sumergidas
12	Agua amoniacal	10 sumergidas
13	Agua corriente	20 minutos
14	Eosina	1-3 minutos
15	Alcohol 95 %	2 minutos
16	Alcohol 95 %	2 minutos
17	Alcohol 100 %	3 minutos
18	Alcohol 100 %	3 minutos
19	Etanol:Xileno (1:1)	1 minuto
20	Xileno I	2 minutos
21	Xileno II	2 minutos
22	Obtención de preparaciones permanentes	

Anexo 4.

Proceso de rehidratación de tejidos de hibridación *in situ*.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (x)	TIEMPO (minutos)
Xileno	2x	5
Alcohol absoluto	2x	1
Alcohol al 95 %	2x	1
Alcohol al 80 %	2x	1
Alcohol al 50 %	1x	1
Agua destilada	6 lavadas	-
1x TNE	1x	5

Nota: No dejar que sequen las laminillas.

Anexo 5.

Proceso de lavado de protocolo de **hibridación *in situ***.

BUFFER	TIEMPO (minutos)	
CONCENTRACIÓN		
SSC 2X	5	2X
SSC 1X	5	2X
SSC 0.5	5	2X
SSC 0.1	5	2X
Buffer I, 1X	5	1X

Nota: El proceso se lleva a cabo a 37 °C

Anexo 6.

Deshidratación de tejidos en **hibridación *in situ***.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	TIEMPO (minutos)
Café de Bismarck	1X	3
Agua deionizada	1X	1
Etanol 80 %	2X	1
Alcohol al 95 %	2X	1
Alcohol absoluto	2X	1
Xileno	2X	5

X. APÉNDICES

Tris NaCl EDTA 10x (TNE 10x)

Tris-HCl 500mM	60.57 g Tris Base
NaCl 100mM	5.84 g NaCl
EDTA 10mM	3.72 g EDTA.2H ₂ O (sal disódica)
H ₂ O dd	990 ml (aforar a 1 L)
pH a 7.4 con HCl; esterilizar, almacenar a 4°C	

TNE 1x: diluir 100 ml de TNE 10x en 900 ml H₂O dd; filtrar através de 0.45 µm, almacenar a 4°C.

Proteinasa K (preparar cada vez que se va a utilizar)

TNE 1x	10 ml TNE 1x
Proteinasa K	0.5 mg Proteinasa K

Formaldehido 0.4%

Formaldehyde 0.4%	5.4 ml Formaldehído al 37%
H ₂ O dd	495 ml

Almacenar a 4°C por más de dos meses.

Amortiguador de hibridación (50 ml de volumen final)

SSC 4x	10 ml SSC 20x
Formamide 50%	25 ml Formamida al 100%
Denhardt's 1x	2.5 ml 20x Denhardt's
Dextran Sulfato 5%	10 ml 25x Dextran Sulfate
DNA 0.5 mg/ml	2.5 ml ADN de esperma de salmon

10 mg/ml. Almacenar a 4°C

Amortiguador SSC 20x (Cloruro de sodio/Citrato de sodio)

NaCl 3M	175.32 g NaCl
Citrato de sodio 0.3 M	88.23 g citrato de sodio.2H ₂ O
DD H ₂ O	900 ml (aforar a 1 L)

pH a 7.0; esterilizar y almacenar a 4°C.

SSC 2x: diluir 100 ml de SSC 20x en 900 ml de H₂Odd; filtrar a través de 0.45 µm. Almacenar a 4°C.

SSC 1x: diluir 50 ml de SSC 20x en 950 ml de H₂Odd; filtrar a través de 0.45 µm. Almacenar a 4°C.

SSC 0.5x: diluir 25 ml de SSC 20x en 975 ml de H₂Odd; filtrar a través de 0.45 µm. Almacenar a 4°C.

SSC 0.1x: diluir 5 ml de SSC 20x en 995 ml de H₂Odd; filtrar a través de 0.45 µm. Almacenar a 4°C.

Solución de Denhardt's 20x.

BSA 0.4%	0.4 g Fracción V de albúmina de suero de bovino
Ficoll 0.4%	0.4 g Ficoll 400
PVP 360 0.4%	0.4 g Polivinilpirrolidona 360
H ₂ Odd	100 ml

Filtrar a través de 0.45 µm y almacenar a 4°C.

Dextran Sulfato 25%

Dextran Sulfato 25%	25 g Dextran Sulfato
H ₂ Odd	80 ml (llevar a 100 ml)

Disolver el dextran sulfato en agua; calentar levemente para facilitar la mezcla. Hacer alícuotas de 10 ml por tubo y almacenar congelado a -20°C.

ADN de esperma de Salmón (10 mg/ml)

ADN de esperma de salmón 10 mg/ml	500 mg ADN de esperma de salmón.
DD H ₂ O	40 ml (llevar a 50 ml)

Añadir el ADN lentamente al agua mientras se agita y calienta ligeramente. Pasar varias veces el ADN a través de una aguja estándar #18. Autoclavar para esterilizar y denaturalizar el ADN. Hacer alícuotas de 2.5 ml en tubos pequeños. Almacenar a – 20°C.

Amortiguador I, 10x

Tris-HCl 1M	121.1 g Tris Base
NaCl 1.5 M	87.7 g NaCl
H ₂ O dd	900 ml (llevar a 1L)

pH 7.5 con HCl; esterilizar y almacenar a 4°C.

Para hacer Buffer I, 1x, diluir 100 ml del stock 10x en 900 ml de H₂O dd. Filtrar a través de 0.45 µm. Almacenar a 4°C

Amortiguador II

Reactivo de bloqueo 0.5% kit)	0.5 g Blocking Reagent #11 (Genius™ 1 kit)
Amortiguador I, 1x	100 ml Amortiguador I, 1x.

Calentar por pequeños periodos en microondas hasta ligera ebullición. Evitar el exceso de burbujas para evitar derrame. Esterilizar y Almacenar a 4°C.

Amortiguador III

Tris-HCl 100mM	12.11 g Tris Base
NaCl 100mM	5.84 g NaCl
H ₂ O dd	990 ml (llevar a 1 L)
pH a 9.5 con HCl	
MgCl ₂ 50mM	10.16 g MgCl ₂ .6H ₂ O

Filtrar a través de 0.45 µm. Almacenar a 4°C

Amortiguador IV, 10x

Tris-HCl 100 mM	12.10 g Tris Base
EDTA 10 mM	3.72 g EDTA.2H ₂ O (sal disódica)
H ₂ O dd	990 ml (llevar a 1 L)

pH a 8.0 con HCl, Esterilizar y almacenar a 4°C

Buffer IV, 1x: diluir 100 ml del stock 10x en 900 ml de H₂O dd; filtrar a través de 0.45 µm. Almacenar a 4°C

Polivinil Alcohol 10%

PVA 10% 10 g Polyvinyl Alcohol (30,000-70,000 PM)

H₂O dd 90 ml (llevar a 100 ml)

Agitar para disolver el PVA (calentar ligeramente). Hacer alícuotas de 10 ml por tubo. Almacenar a -20°C.

Solución de desarrollo (añadir NBT/BCIP antes de utilizar).

Amortiguador III con PVA and Levamisole 1.0 ml

Solución stock NBT/BCIP 20 µl

AMORTIGUADOR III CON PVA AND LEVAMISOLE

Amortiguador III 1x 90 ml Buffer III

PVA 1% 10 ml Polyvinyl Alcohol al 10%

Levamisole 1mM 24 mg Levamisole

Mezclar y almacenar a 4°C

Bismarck Brown Y 0.5%

Bismarck Brown Y 0.5% 5 g Bismarck Brown Y

H₂O dd 1000 ml

Agitar hasta disolver completamente. Filtrar a través de papel Whatman #1. Almacenar a temperatura ambiente.