

RESULTADOS

I. CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL SINDROME DE TAURA Y LA ENFERMEDAD QUE CAUSA

Todos los estudios de caracterización se realizaron con el material colectado en el primer muestreo. La muestra de camarones cultivados en granjas de San Blas, Nayarit; Guasave, Los Mochis, Sinaloa y San Luís Río Colorado, Sonora, procesados para la detección del agente causal de los brotes epizooticos, fueron positivas. En el proceso de ultracentrifugación se aislaron partículas virales, icosaédricas, observadas al MET (datos no mostrados). Al inocular las bandas de los gradientes en camarones sanos, se logró reproducir la patología típica del virus del síndrome de Taura (VST), descrita en *L. vannamei* cultivados en Ecuador mediante los bioensayos. Para cada una de las localidades se realizó un proceso diferente de ultracentrifugación.

1.- Purificación de virus por gradientes de densidad:

A.- Gradientes de sacarosa: En los gradientes discontinuos se observaron 2 ó 3 bandas. La banda intermedia, situada entre el gradiente 30% y 40% fue la que contenía la mayor cantidad de partículas virales, siendo estas por consiguiente más escasas en la banda superior localizada entre el gradiente 30% y 20% y la banda inferior, localizada entre el gradiente 50 y 40% de sacarosa, tal como se determinó al MET (datos no mostrados).

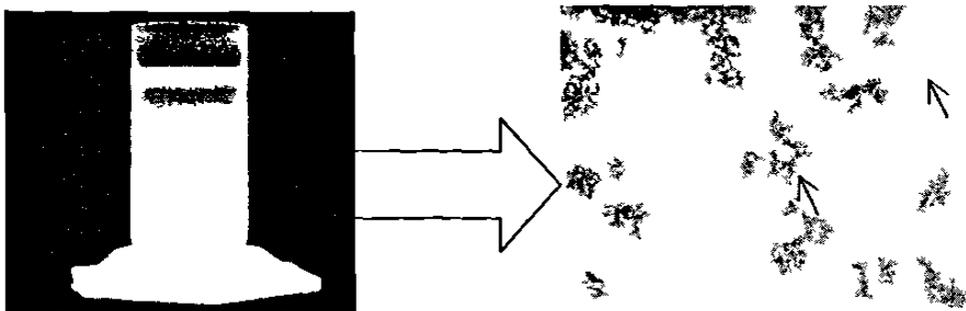


Fig. 5. Purificación de partículas virales. (A) Gradiente de cloruro de cesio donde se presentan dos bandas analizadas (B) Tinción negativa observada al MET (25, 000 X).

B.- Gradiente de cloruro de cesio: Las lecturas de absorvancia en las fracciones eluídas (a una longitud de onda de 340 nm), registradas para cada ensayo, se complementaron la lectura del IR para determinar la densidad de las fracciones obtenidas, según la observación del bandeó (Fig. 5). Los resultados obtenidos en los cuatro procedimientos, correspondientes a cada localidad, reportan en tres de ellos la presencia de dos importantes picos. Sin embargo uno de los picos que se presentó con mayor acentuación, no correspondió a la densidad esperada del virus, sino a material identificado como restos celulares o posibles fragmentos protéicos arrastrados durante el proceso de maceración y purificación.

La presencia evidente de un segundo pico (menos acentuado en tres ensayos), o único (en el cuarto ensayo), corresponde a lecturas de 0.25 (tubo 8), 0.08 (tubo 5), 0.07 (tubo 6) y 0.5 (tubo 5) a una absorvancia de 340 nm, en los procedimientos de purificación realizados en material infectado de San Blas, Guasave, Los Mochis y San Luis Río Colorado, respectivamente. Las lecturas del IR, en general, fueron de 1.363, 1.364, 1.367 y 1.365 para cada una. Al aplicar la formula:

$$\rho = 10.2402 (\cap) - 12.6483$$

Donde ρ es la densidad de la fracción en g ml^{-1} en CsCl.

\cap corresponde a la lectura del índice de refracción

Los resultados indican densidades que oscilaron entre 1.31 a 1.34 g ml^{-1} .

El ámbito de las densidades calculadas, es el que corresponde a las familias Birnaviridae (1.33 g ml^{-1}); Calciviridae) (1.33-1.39 g ml^{-1}); Nodaviridae (1.30-1.35 g ml^{-1}) y Picornaviridae (1.33-1.45 g ml^{-1}) del grupo de los RNA virus (Trudel y Payment, 1993). En los DNA virus, los Adenoviridae presentan una densidad de 1.33-1.35. g ml^{-1} Coincidentemente, todos ellos corresponden a virus desnudos

(sin envoltura) (Trudel y Payment, 1993). Las lecturas de absorvancia e índices de refracción se describen a continuación.

C.- Purificación viral del material procedente de San Blas, Nayarit: El primer pico correspondió a lecturas de absorvancia de 0.0598, 1.1903 y 0.0360. En el segundo, el rango fue de 0.0360 a 0.0020 (Tabla 3, Fig. 6).

La absorvancia registrada en el segundo pico, que contenía las partículas virales, fue de 0.0824 y a un IR= 1.3630. La densidad calculada (ρ) con base en el valor obtenido del IR, fue de 1.320 g ml⁻¹. Estos datos son los que corresponden a la fracción 5 de los eluidos del gradiente de la muestra procesada.

Tabla 5. Absorvancia de las fracciones obtenidas de los gradientes de CsCl del material colectado en Nayarit. Proceso de purificación de virus a partir de casos agudos observados en *L. vannamei* de granjas situadas en San Blas, Nayarit.

| Tubo de elución | A 340 nm | I.R. | Densidad |
|-----------------|---------------|---------------|--------------|
| 1 | 0.0598 | 1.3410 | 1.083 |
| 2 | 1.1903 | 1.3440 | 1.114 |
| 3 | 0.0360 | 1.3490 | 1.165 |
| 4 | 0.0669 | 1.3550 | 1.227 |
| 5 | 0.0824 | 1.3630 | 1.320 |
| 6 | 0.0050 | 1.3680 | 1.360 |
| 7 | 0.0030 | 1.3730 | 1.411 |
| 8 | 0.0020 | 1.3800 | 1.483 |
| 9 | 0.0020 | 1.3830 | 1.513 |
| 10 | --- | --- | --- |
| 11 | --- | --- | --- |
| 12 | --- | --- | --- |

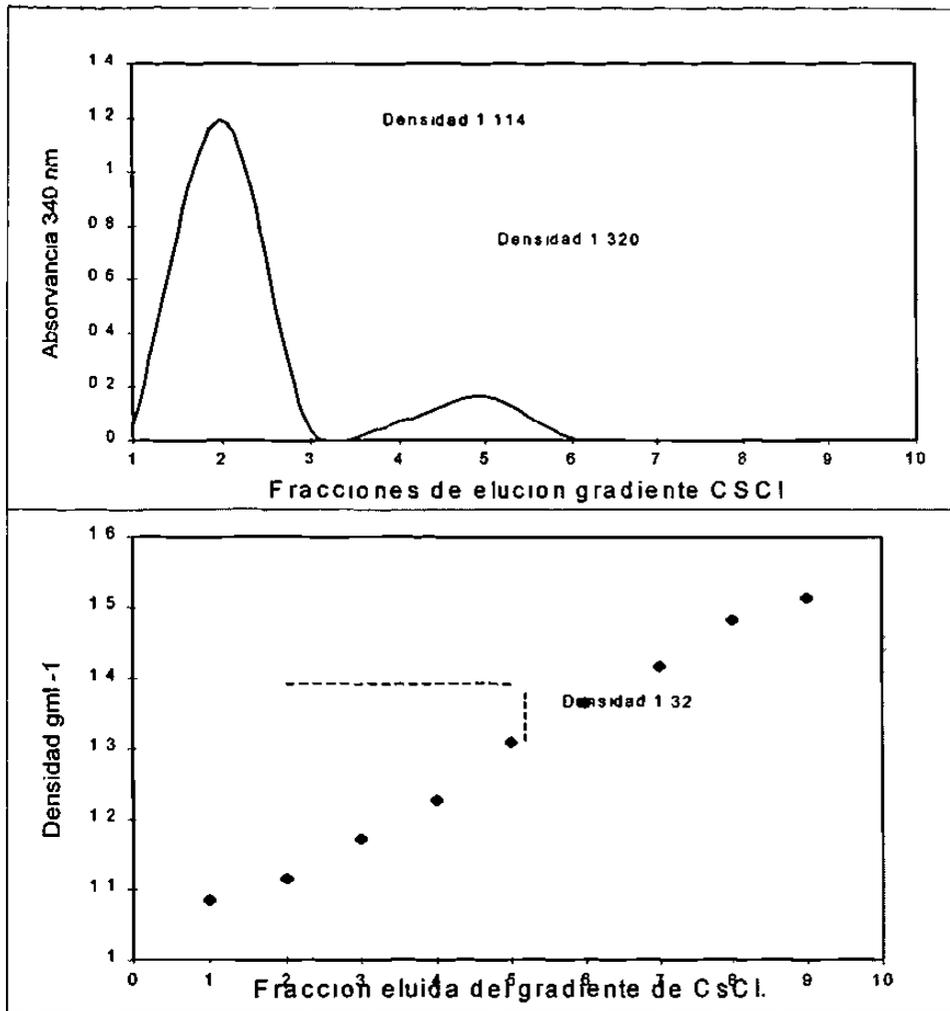


Fig. 6. Absorvancia y densidad en las fracciones de los gradientes eluidos de muestras de Nayarit. (A) Absorvancia de las fracciones. (B) La densidad del segundo pico corresponde a 1.32 g/ml¹.

D.- Purificación viral del material procedente de Guasave: Las lecturas de absorvancia del segundo pico (Fig. 7) fueron de 0.0148 a 0.0073. La lectura de 0.0786 fue la que correspondió a la fracción de mayor concentración de partículas virales. La densidad correspondiente de esta, fue de 1.31-1.34 g/ ml⁻¹, de acuerdo a las lecturas del IR obtenidos (1.3620 y 1.3670). En la Tabla 4 y Fig 7, se cita también la lectura de densidad del primer pico donde se detectó material proteínico, y restos celulares, la cual fue de 1.24 g/ml⁻¹.

Tabla 6. Absorvancia de las fracciones s de los gradientes de CsCl en el proceso de purificación de virus a partir de casos crónicos observados en *L. vannamei* de granjas situadas en Guasave, Sinaloa.

| Tubo de elución | A 340 nm | I.R. | Densidad |
|-----------------|---------------|---------------|--------------|
| 1 | 0.0856 | 1.3435 | 1.109 |
| 2 | 0.2373 | 1.3450 | 1.124 |
| 3 | 0.0122 | 1.3510 | 1.186 |
| 4 | 0.0222 | 1.3570 | 1.247 |
| 5 | 0.0148 | 1.3610 | 1.293 |
| 6 | 0.0786 | 1.3620 | 1.313 |
| 7 | 0.0086 | 1.3670 | 1.340 |
| 8 | 0.0073 | 1.3660 | 1.355 |
| 9 | 0.0003 | 1.3700 | 1.380 |
| 10 | 0.0003 | 1.3760 | 1.442 |
| 11 | 0.0003 | 1.3760 | 1.447 |
| 12 | 0.0002 | 1.3845 | 1.529 |

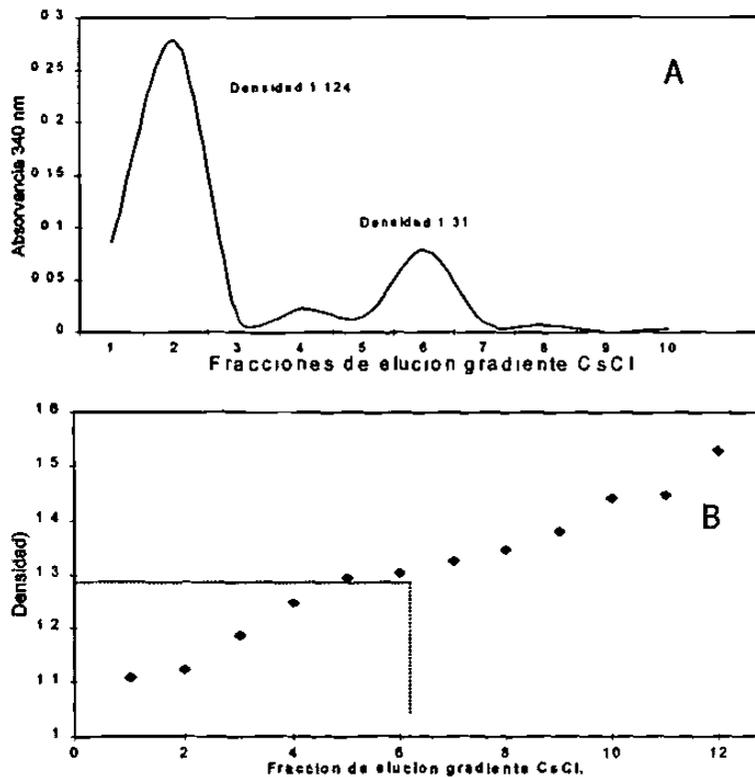


Fig. 7. Absorvancia de las fracciones de virus purificadas del material colectado de Guasave. (A) Absorvancia y (B) densidad correspondiente de las fracciones obtenidas con base en los datos calculados del índice de refracción

E.- Purificación viral del material procedente de Los Mochis: El material procesado corresponde a camarón azul (*L. stylirostris*). Estos organismos eran adultos, de 20-22.1 g de peso. Los ejemplares se observaron a simple vista con expansión de cromatóforos rojos en todo el cuerpo, particularmente en apéndices, como son pereopodos, pleopodos, uropodos, telson y antenas, pero a la vez, la tercera parte de la población estudiada presentó el curso crónico del síndrome referido en otros países latinoamericanos como síndrome de Taura. Este consistía en necrosis cuticular extensiva, similar a la ocasionada por bacterias del género *Vibrio* sp. La muestras de 5 kg de camarón, fue enviada al CNSA para análisis, debido a la mortalidad extensiva que se detectó en la estanquería. Como dato extraordinario, se menciona que el reporte del síndrome en camarón azul es raro, debido a que no es un hospedero preferencial para el virus de Taura. La fracción con las partículas virales se detectó a partir del tubo 4 (Tabla 5, Fig 8; DO 0.1855), culminando en el tubo 7 (0.0482) y terminando en el tubo 9 (0.0058).

Tabla 7. Absorvancia y densidad analizadas con muestras de *L. stylirostris*, cultivados en Los Mochis, Sinaloa. La densidad se calculó como se describe en la metodología.

| Tubo de elución | A 340 nm | I.R. | Densidad |
|-----------------|----------|--------|----------|
| 1 | 0 0081 | 1 3450 | 1.124 |
| 2 | 0 0043 | 1 3460 | 1.146 |
| 3 | 0 1844 | 1 3500 | 1.175 |
| 4 | 0 1855 | 1 3538 | 1.214 |
| 5 | 0 6908 | 1 3570 | 1.247 |
| 6 | 0 1150 | 1 3600 | 1.278 |
| 7 | 0.0482 | 1.3630 | 1.320 |
| 8 | 0.2535 | 1.3670 | 1.350 |
| 9 | 0 0058 | 1.3720 | 1.401 |
| 10 | 0 1160 | 1.3780 | 1.462 |
| 11 | 0 0049 | 1.3820 | 1.503 |
| 12 | 0 0071 | 1.3830 | 1.513 |

En el proceso de purificación viral, en gradientes de cloruro de cesio, se detectó el segundo pico, graficado con las lecturas de absorvancia a 340 nm. La lectura correspondiente fue de 0.0492 en la fracción 7, Fig. 8). Esta misma, presentó una lectura de índice de refracción de 1.3630. Al aplicar la fórmula ρ , se calculó una densidad de 1.320 g/cm³ para la misma fracción. Al igual que el resto de las fracciones con esta característica, ésta fue inoculada en camarones sanos, de laboratorio, para reproducir el cuadro clínico y una segunda muestra se utilizó para observación al MET. Los datos obtenidos se describen en la Tabla 5, Fig. 8.

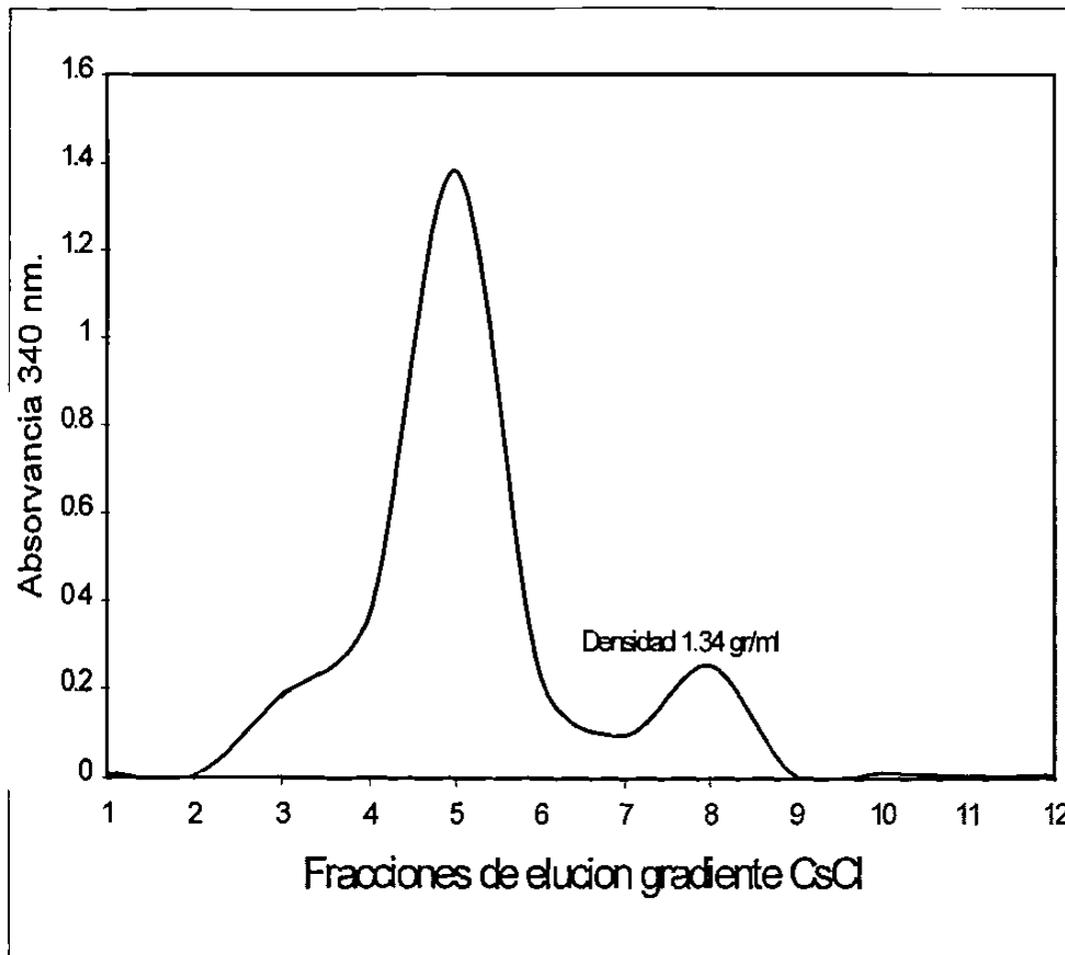


Fig. 8 A. Gráfica de absorvancia de las fracciones obtenidas en gradiente de cloruro de cesio, a partir de las muestras colectadas en Los Mochis, Sinaloa.

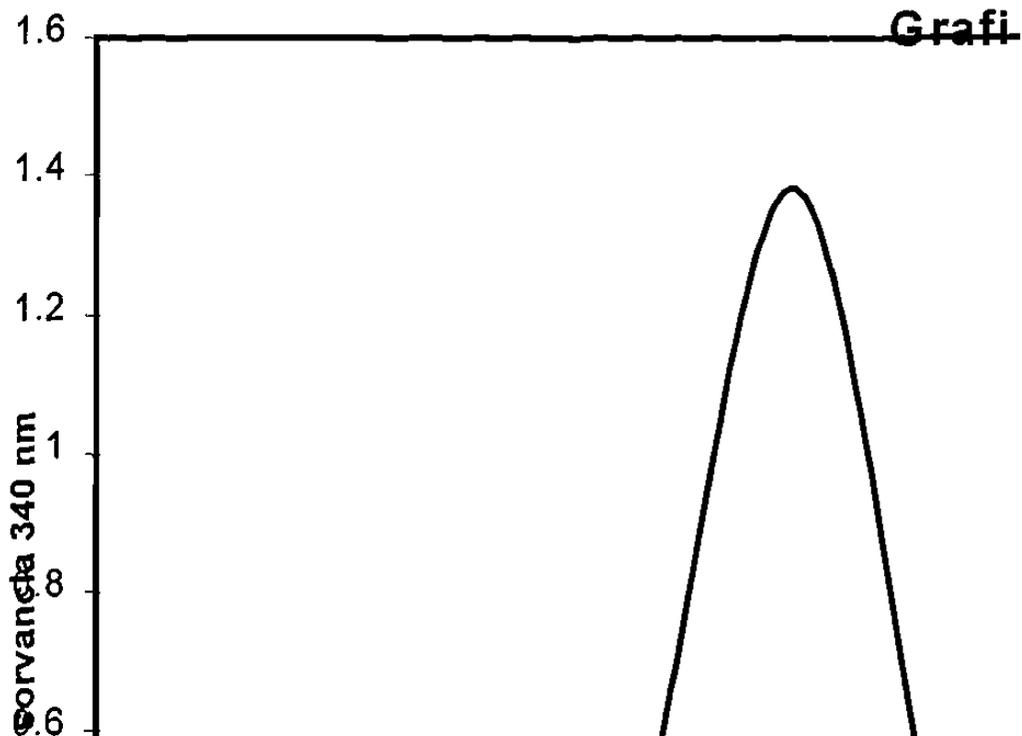


Fig. 8B. Gráfica de la densidad (gml^{-1}) de cada fracción, obtenidos con base en las lecturas del índice de refracción.

F.- Purificación viral del material procedente de San Luis Río Colorado: Los organismos procesados por ultracentrifugación, corresponden a una epizootia detectada en la fase aguda del síndrome, la cual afectó a *L. vannamei* en forma masiva. Estos organismos presentaron un peso promedio de 15 g, y exhibían la expansión de cromatóforos, característica de la fase mencionada.

La densidad de la fracción eluida, correspondiente al tubo 5, se determinó en 1.334 gml^{-1} , de acuerdo a la lectura de índice de refracción (1.3650) y a la lectura de absorbancia (0.5337).

Las fracciones eluidas, 4, 5 y 6 correspondieron al único pico detectado en los gradientes con una densidad que correspondía a partículas virales (Tabla 6, Fig. 9).

Tabla 8. Lecturas de las muestras correspondientes a fracciones eluidas de camarones *L. vannamei* en la fase aguda del síndrome, originaria de San Luis, Río Colorado.

| Tubo de elución | A 340 nm | I.R. | Densidad |
|-----------------|----------|--------|----------|
| 1 | 0 0020 | 1.3425 | 1.099 |
| 2 | 0 0020 | 1 3440 | 1.114 |
| 3 | 0 0020 | 1.3460 | 1.140 |
| 4 | 0 0148 | 1.3520 | 1.196 |
| 5 | 0.5337 | 1.3650 | 1.334 |
| 6 | 0 0153 | 1.3980 | 1.667 |
| 7 | 0.0153 | 1.4000 | 1.696 |
| 8 | 0 0025 | 1.4010 | 1.696 |
| 9 | 0 0509 | 1.4110 | 1.801 |

La densidad de la fracción eluida del tubo 5, fue de 1.334 g ml^{-1} , de acuerdo al $\text{IR}=1.3650$.

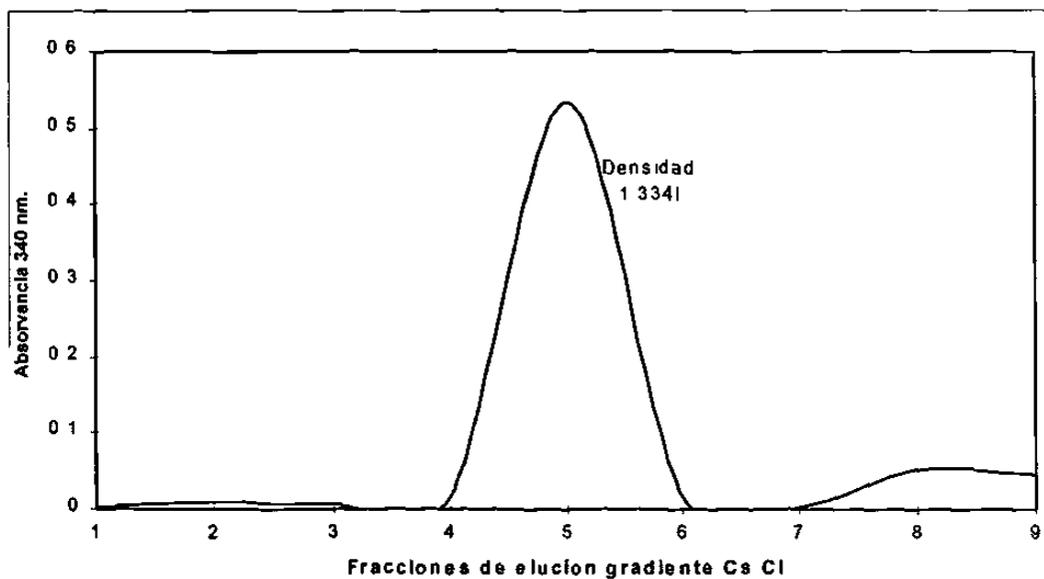


Fig. 9 A. Gráfica de absorvancia de las fracciones del material procedente de San Luis Río Colorado, Sonora. Note que este presentó un solo pico.

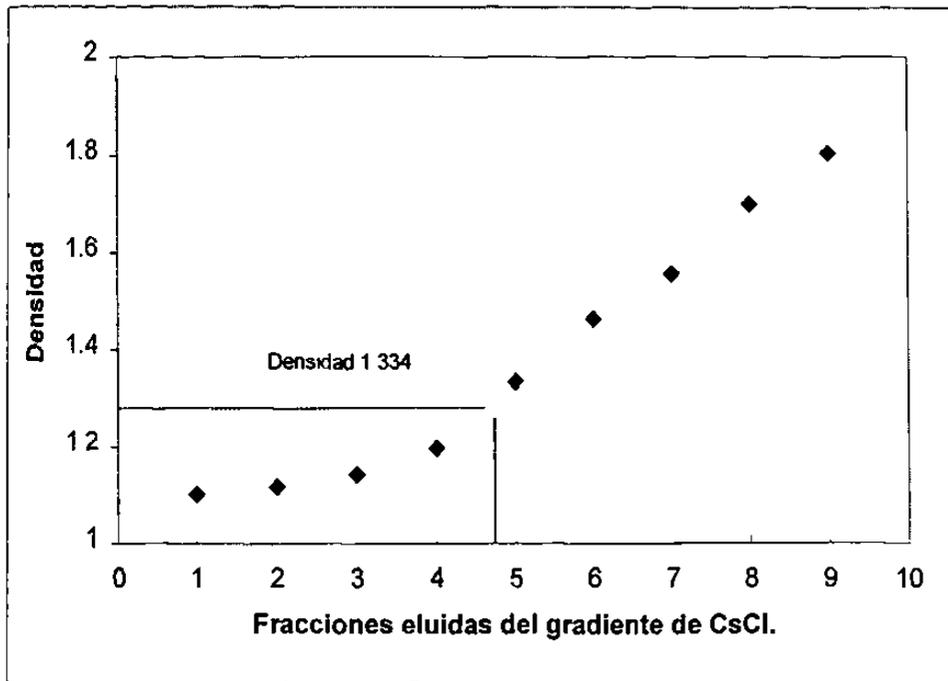


Fig. 9B. Gráfica de la densidad (g ml^{-1}) para determinar el valor correspondiente del IR para el tubo eluido de la fracción 5.

2.- Microscopía electrónica de transmisión

A.- MET de las fracciones eluidas: Las fracciones donde se detectaron lecturas de densidad correspondientes a partículas virales, provenientes de los gradientes de cloruro de cesio, presentaron partículas entre un rango de 31-32 nm de diámetro máximo, con 5 a 6 lados en la periferia, lo cual indica que se trata de partículas icosaédricas, según las observaciones realizadas al MET con la tinción negativa de ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo.

Los cuatro procedimientos realizados de acuerdo a los sitios de colecta de material biológico (San Blas, Nayarit; Guasave y Los Mochis, Sinaloa y San Luis Río Colorado, Sonora), coincidieron al presentar partículas icosaédricas con las dimensiones mencionadas anteriormente. En las figuras 10 y 11 se presentan las observaciones realizadas al MET.



Fig. 10. Microfotografía tomada a 25,000 X de partículas virales icosaédricas teñidas con ácido fosfotúngstico, donde se observa la cápside electrolúcida y material genómico electrodenso.

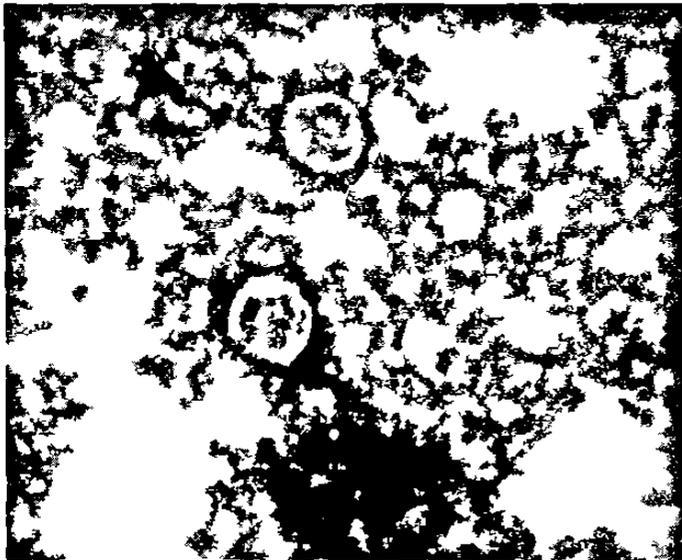


Fig. 11. Partículas virales obtenidas de muestras de camarón infectado con VST, procedentes de Nayarit, Sonora y Sinaloa, México (25, 000 X).

B.- MET de camarones infectados: En el tejido fijado con glutaraldehido, proveniente de los organismos infectados, se detectaron partículas esféricas, de 31 a 32 nm de diámetro, al observarse a 132, 500 X (Fig. 12).

Además de la presencia de partículas esféricas ó icosaédricas y sin envoltura, se observaron cristales aparentemente de fosfato de calcio. La muestra de tejido mostrada en la figura 12, fue tomada del dorso de uno de los camarones infectados experimentalmente.

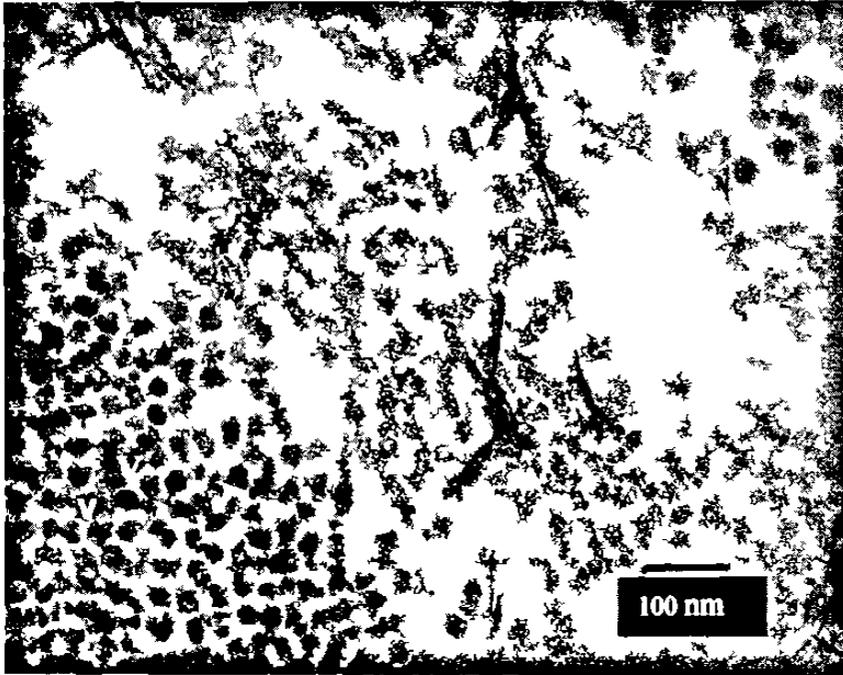
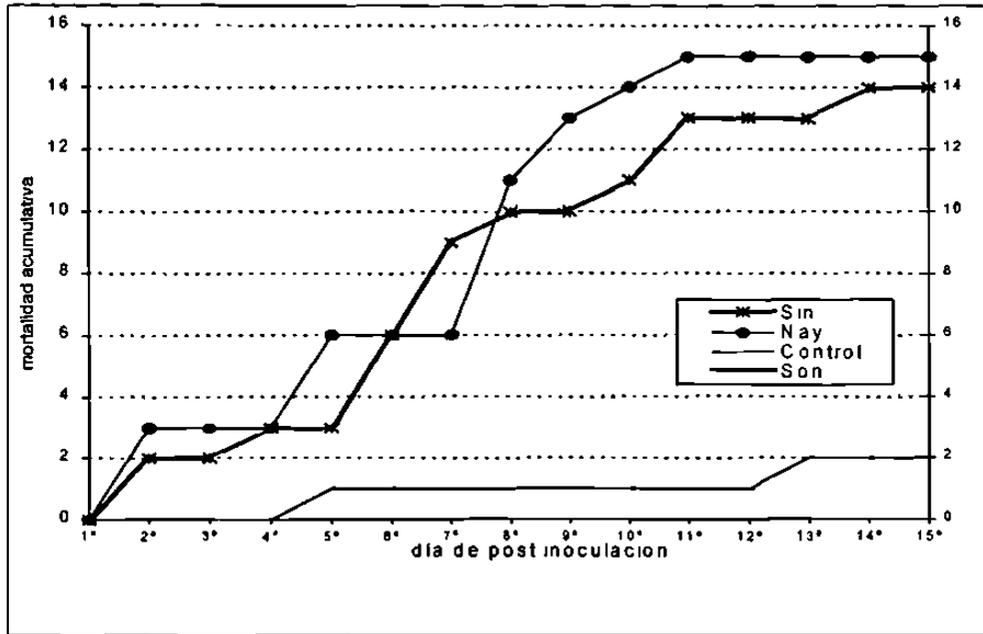


Fig. 12. Ultraestructura de un corte de tejido de *L. vannamei* infectado experimentalmente, mostrando los viriones icosaédricos, que constituyen los cuerpos de inclusión citoplásmicos (V) y cristales de fosfato (F). 135, 200 X.

3.- Ensayos de bioinfectividad

Las características clínicas del síndrome de Taura se observaron a partir del segundo día en los *L. vannamei* inoculados con las suspensiones virales purificadas de camarones cultivados en Nayarit, Sinaloa y Sonora. El cuadro inició con una coloración rojiza en los urópodos y antenas y nado repentino de extremo a extremo del acuario en forma intermitente. Los signos indicativos coincidieron con el cuadro preagudo y agudo de la enfermedad conocida como virus del síndrome de Taura (Lightner y cols., 1997).



| | 1° | 2° | 3° | 4° | 5° | 6° | 7° | 8° | 9° | 10° | 11° | 12° | 13° | 14° | 15° |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Temp (°C) | 28 | 28 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 31 | 30 | 30 | 30 |
| (Salinidad°/oo) | 25 | 25 | 25 | 26 | 26 | 26 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| pH | 7.8 | 7.8 | 7.8 | 7.8 | 7.8 | 7.9 | 7.9 | 7.9 | 7.8 | 7.8 | 7.8 | 7.9 | 7.8 | 7.8 | 7.8 |
| ma | 2 | 2 | 3 | 3 | 6 | 9 | 10 | 10 | 11 | 13 | 13 | 13 | 14 | 14 | 14 |

Fig. 13. Bioensayo efectuado con *15 L vannamei*, inoculados con partículas virales del material colectado en Sonora y Sinaloa, bandeadas en gradiente de cloruro de cesio. La tabla de datos muestra los parámetros físicos del agua del bioensayo (ma= mortalidad acumulativa).

A.- Inóculo viral procedente de Sonora y Sinaloa: Con la suspensión viral de ambas localidades, se obtuvo el mismo resultados de mortalidad acumulativa y sobrevivencia (%). Dos de los ejemplares inoculados con la suspensión viral, murieron al segundo dpi, mientras que al octavo dpi, la mortalidad acumulativa fue de 10 organismos. En la Fig. 13 se observan con detalle los datos, quedando solo un sobreviviente con los signos indicativos (macroscópicos) durante el experimento del primer bioensayo realizado con 15 organismos.

En los bioensayos experimentales se observó sobrevivencia del 33.3% hasta el octavo dpi. En el décimo dpi la mortalidad aumentó al 73.3 %, pero al llegar al

14 dpi, se registró la máxima que fue de 93.33 %, sobreviviendo uno de 15 organismos inoculados (6.7 %, Fig. 14).

En el grupo control, constituido de 15 ejemplares del mismo origen y especie, la mortalidad acumulativa alcanzó el 13.3 % (2 organismos) en el mismo periodo de tiempo. Con respecto a los factores físicos determinados, no se observaron cambios trascendentales en el grupo control y en el grupo del ensayo de infectividad (Fig. 13).

El índice de sobrevivencia, expresado en porcentaje, detectándose que al tercer dpi la sobrevivencia alcanzó el 86.7 %, disminuyendo progresivamente hasta el 33.3 % en el noveno dpi, 26.6 % en el décimo dpi y al final del seguimiento se detectó un 6.7 % de organismos sobrevivientes, los cuales, como se indica anteriormente, presentaban signos clínicos del STV (Fig. 14).

B.- Inóculo viral procedente de Nayarit: La mortalidad acumulativa se mantuvo en el 20 % (3 ejemplares) del segundo al cuarto dpi (80 %) de sobrevivencia. Del quinto al séptimo esta aumentó al 40 % (6 organismos). En el décimo llegó al 93.3 %, contabilizándose 14 organismos, con un solo sobreviviente (6.7 % de sobrevivencia). Al décimo primer dpi, el índice de sobrevivencia llegó al 100 %. Los signos clínicos macroscópicos de los ejemplares se presentaron entre el segundo y tercer día en la población inoculada, coincidiendo con los descritos anteriormente.

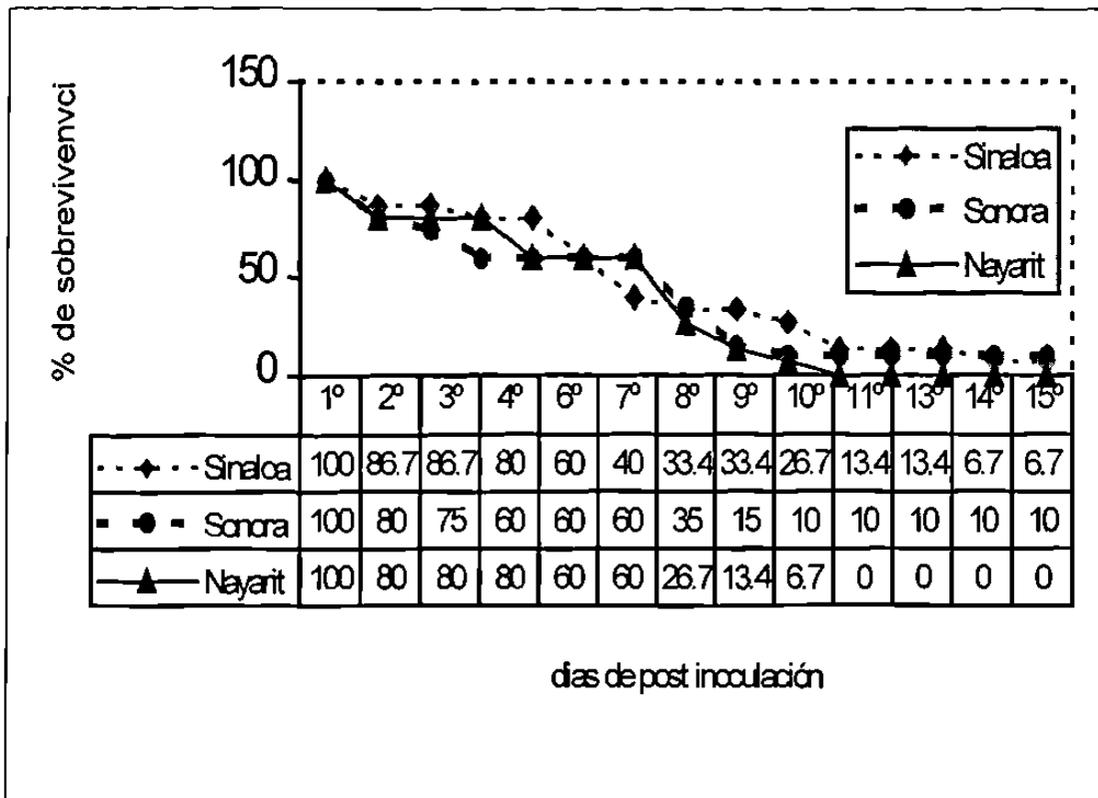


Fig. 14. Índice de sobrevivencia en los bioensayos efectuados con inóculos de las localidades de estudio.

En los bioensayos realizados, no se observó el inicio de la fase crónica que debía consistir en el desarrollo de lesiones cuticulares melanizadas multifocales, descritas para el virus del síndrome de Taura (Hasson y cols., 1995).

4.- Hibridación de ácidos nucleicos

A) Hibridación en membranas de soporte sólido: Para esta fase confirmatoria de la identificación del agente causal, fueron seleccionadas dos muestras (3 µl de cada una) de las fracciones obtenidas en los gradientes, más un control negativo que consistió en tejido de sementales sanos, de laboratorio, provenientes de Florida, procesados con la misma técnica de ultracentrifugación (Fig. 15).

Los resultados observados son los siguientes: Las fracciones eluídas de los gradientes de cloruro de cesio presentaron resultados positivos, hibridizando con la sonda comercial. La diferencia en la señal de hibridación, proporcionada por la reducción del substrato (BCIP/NBT), se observa más aumentada en las muestras de Sinaloa y menos acentuada en los eluídos de Sonora, pero esto se debe a la concentración de las partículas virales en la muestra eluída. El control negativo (muestra 4) y positivo (+) se presentan en la misma membrana de prueba. La extracción de RNA se realizó con la técnica de Trizol, mencionada en la metodología.

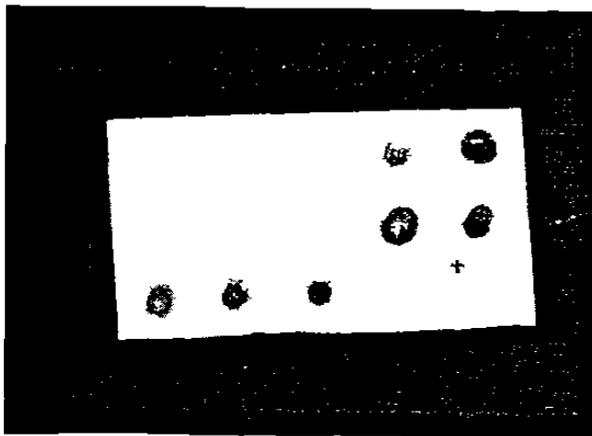


Fig. 15: Hibridación en membrana de soporte solido realizado en las fracciones eluídas de los purificados virales con la sonda comercial DiagXotics. 1 - 2: Fracciones de camarones cultivados en Sonora. 3 y 5: Fracciones de purificados virales de Sinaloa. 6 y 7: Fracciones originarias de granjas de Nayarit. 4: Control negativo. (+) Control positivo.

B.- Hibridación *in situ*. Los cortes histológicos, preparados con secciones de tejido proveniente de camarones con infección natural, así como los cortes de ejemplares fijados en los ensayos de bioinfectividad, presentaron reacción con la sonda en el citoplasma de las células infectadas con VST, así como el citoplasma de las células de tejido conectivo subcuticular. Los núcleos picnóticos o cariorecticos de las zonas lesionadas, no reaccionan con la sonda (Fig. 16 y 17). Las fracciones eluídas de las muestras de *L. stylirostris*, cultivada en Los Mochis, e inoculadas en *L. vannamei*, se presentan en la figura 17 A y de ejemplares estudiados de Sonora, con el mismo resultado positivo a la sonda figura 17 B.



Fig. 16. Corte de tejido subcuticular de camarón *L. vannamei* cultivado en Nayarit. El citoplasma de las células epiteliales se observa de color púrpura al estar infectadas con el virus.



Fig. 17. Hibridación in situ de células de tejido epitelial de la subcutícula de camarón. (A) Subcutícula de un pereopodo con áreas reactivas a la sonda marcada con DIG. (B) Subcutícula de la región dorsal del abdomen. El citoplasma de las células infectadas reaccionan apropiadamente con un color púrpura oscuro (flecha), pero no en los fragmentos de los núcleos cariorecticos y en los cortes de H & E.

5.- Microscopía de luz.

Una vez que se observaron los resultados de hibridación y de microscopía electrónica, algunos de los ejemplares fijados se utilizaron para determinar el cuadro histopatológico causado por el virus de Taura. Los cortes, teñidos con hematoxilina y eosina, demostraron la presencia de lesiones dispersas en la subcutícula, a nivel del epitelio, constituidas por cuerpos de inclusión citoplásmicos y esféricos, basofílicos, rodeados por células epiteliales necróticas, según lo refleja la fragmentación (cariorexis) y picnosis de los núcleos, sin observar hemocitos alrededor del tejido necrosado (Fig. 18) en comparación con un corte histológico de un ejemplar utilizado como control negativo (Fig. 19).



Fig. 18. Corte de epitelio subcuticular de un control negativo de *L. vannamei* donde se muestra la apariencia normal del epitelio y tejido conectivo subyacente. Fig. 19. Epitelio subcuticular con necrosis, enmarcada por la picnosis y cariorexis nuclear (flecha) junto con los cuerpos de inclusión citoplásmicos, esféricos. en la zona afectada.

6.- Electroforesis por SDS-PAGE:

Los corrimientos electroforéticos de las muestras que correspondían a los bandeos, se realizaron con material previamente lavado en solución amortiguador TN y precipitado a 45, 000 rpm.

A.- Gradiente de sacarosa: En la migración electroforética (Fig. 20), al graficarse los datos de la distancia recorrida (Tabla 9) en la abscisa x con el peso molecular de los marcadores (M_r en kD, y), los datos se ajustaron a una curva exponencial ($y=ae^{bx}$), gráfíandose estos en la Fig. 21 B.

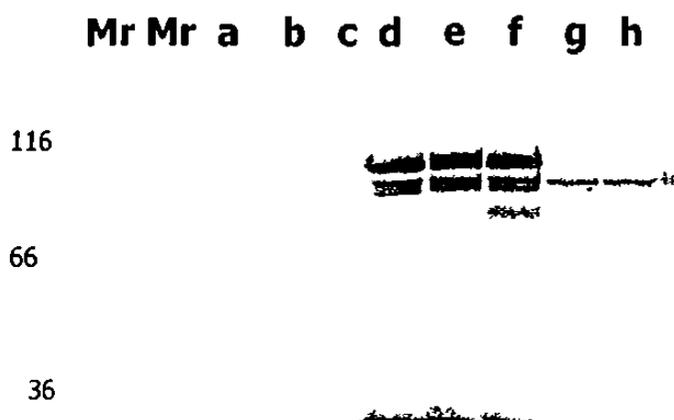


Fig. 20. Gel de poliacrilamida con las proteínas correspondientes a las fracciones de sacarosa. M_r = Marcadores de peso molecular (kD); a-c) Camarones infectados con el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV); d-f) camarones infectados con VST; g-h) controles negativos y camarones sanos provenientes de Costa Rica.

Las bandas de proteínas que caracterizaron el corrimiento electroforético, presentaron un peso molecular 161.21; 138.75; 130.68; 112.46; 73.89; 62.35; 47.1 y 34.89 kD. En la Fig. 21A se presentan la gráfica obtenida con los datos originales y en la Fig. 21B con el peso molecular estimado de acuerdo a la ecuación $y=284.576 e^{-0.029x}$. La F estimada fue de 244,244.84 con una significancia estadística de $p < 0.01$ y un coeficiente de determinación (r^2) de 1.0

Tabla 9. Datos numéricos de la migración electroforética del VST semipurificado en gradientes de sacarosa. Estos se aplicaron a la ecuación $y = ae^{bx}$ para calcular el peso de las proteínas del virus.

| Ecuación $y = ae^{bx}$ | | | a: 284.576 |
|--|-------|----------|-----------------|
| x: Migración en mm de las Prot. Problema | | | |
| y: Peso en Kda Estimado por la ecuación | | | P.M real |
| x | xb | e^{bx} | y = Peso en Kda |
| 19 | -0.57 | 0.5655 | 161.2127 |
| 21 | -0.63 | 0.5325 | 151.8051 |
| 24 | -0.72 | 0.4867 | 138.7484 |
| 26 | -0.78 | 0.4584 | 130.6807 |
| 31 | -0.93 | 0.3945 | 112.4641 |
| 43 | -1.29 | 0.2753 | 78.4825 |
| 45 | -1.35 | 0.2592 | 73.8927 |
| 51 | -1.53 | 0.2187 | 62.3470 |
| 60 | -1.8 | 0.1652 | 47.0952 |
| 70 | -2.1 | 0.1224 | 34.8938 |
| 71 | -2.13 | 0.1199 | 34.1811 |

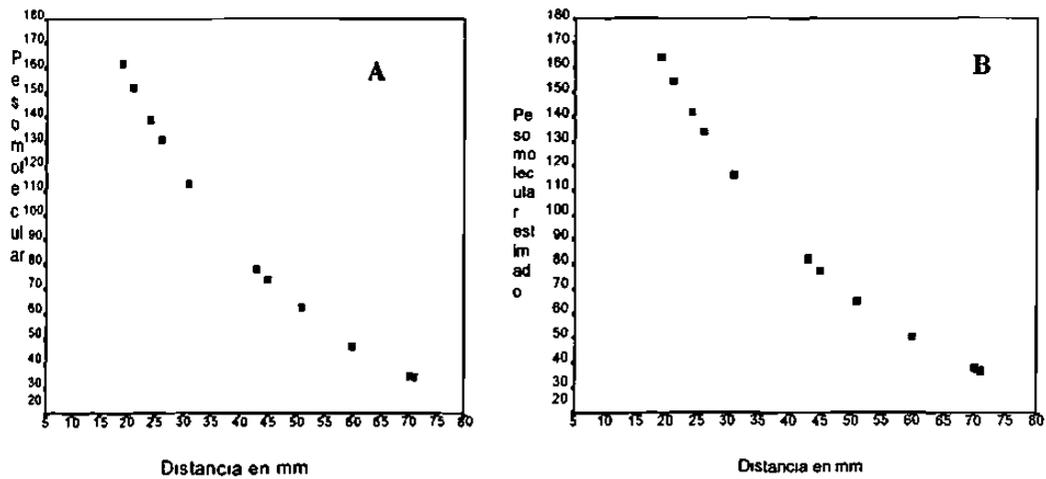


Fig. 21. Gráficas para determinar el peso de las proteínas del virus VST semipurificado en los geles de poliacrilamida. (A) Peso molecular con los datos originales y. (B) datos estimados de acuerdo a la ecuación $y = ae^{bx}$.

B.- Gradientes de cloruro de cesio: El patrón electroforético de las fracciones eluidas y seleccionadas de acuerdo a la lectura de absorbancia e índice de refracción se muestra en la Fig. 22, corriéndose en un gel de poliacrilamida al 10 %. Los datos originales se presentan en la Tabla 10 y en la gráfica de la Fig. 23A.

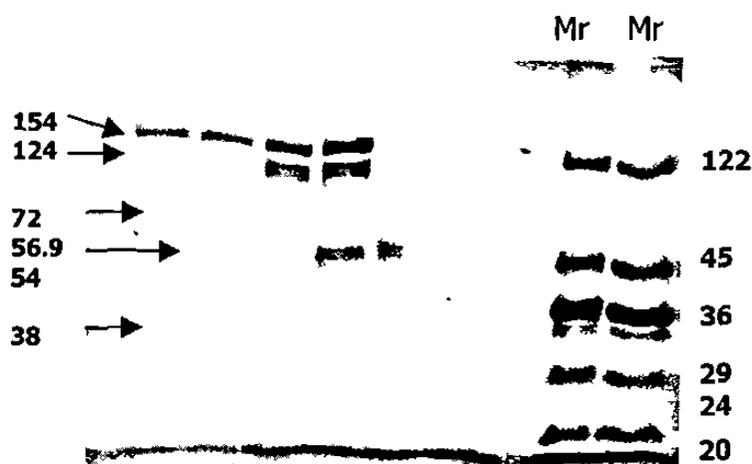


Fig. 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % de las fracciones eluidas de las bandas obtenidas en la purificación del VST en cloruro de cesio (Mr=Marcadores de peso molecular en kD).

La electroforesis en poliacrilamida, de los bandeos realizados en cloruro de cesio, mostraron la presencia de proteínas con un peso molecular de 154; 124; 72; 56.9; 54 y 38 kD.

La gráfica de la Fig. 23B se realizó con base al peso molecular estimado donde $y = 210.139 e^{0.029 x}$. La significancia $p = 0.0001$ con un coeficiente de determinación r^2 de 1.0 y $F = 4,041,887.7$ (Fig. 23B).

Tabla 10. Datos numéricos de los valores obtenidos para el peso molecular (kD) de las proteínas electroforadas de las fracciones de cloruro de cesio.

| x | y peso en kD | x ² |
|----|--------------|----------------|
| 17 | 154 3685653 | 0.023094201 |
| 20 | 124 361525 | 0.018605018 |
| 21 | 116.5478513 | 0.017436059 |
| 30 | 72 52448684 | 0.010849975 |
| 36 | 56.90803728 | 0.008513687 |
| 37 | 54 87160207 | 0.008209027 |
| 40 | 49 46706517 | 0.007400485 |
| 47 | 39 91772504 | 0.005971863 |
| 48 | 38 81549131 | 0.005806964 |
| 61 | 28.22066561 | 0.004221933 |
| 67 | 24 91015591 | 0.003726666 |
| 71 | 23 06122269 | 0.003450058 |

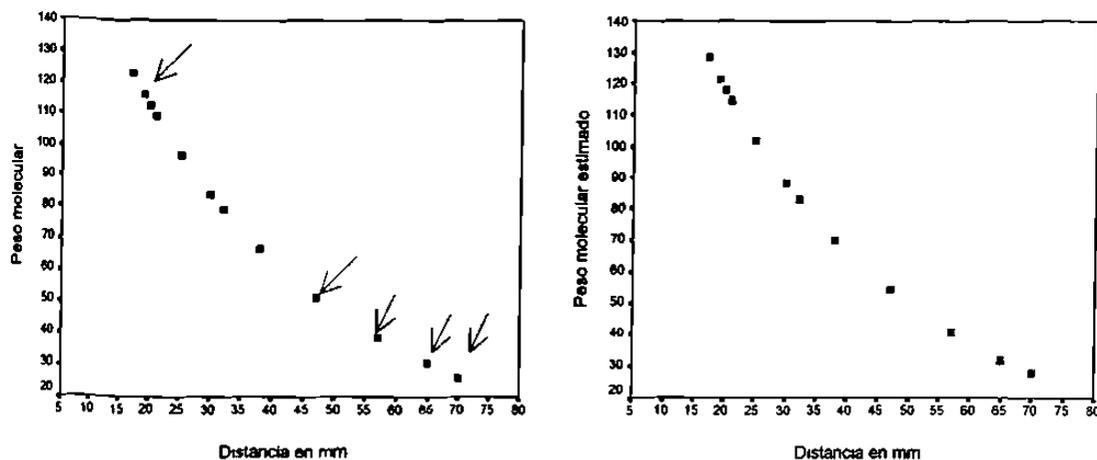


Fig. 23. Gráficas del peso molecular de las fracciones eluidas de cloruro de cesio. (A) Gráfica del peso molecular con los datos originales y (B) Peso molecular estimado de acuerdo a la ecuación $y = 210.139 e^{-0.029 x}$.

7.-Extracción de RNA:

El proceso de extracción se inició a partir de las fracciones eluidas. Con el producto se realizó hibridación en membranas de soporte sólido, mostrado en la Fig. 15 y se corrió en geles de agarosa. Las bandas observadas en las fracciones de las siguientes figuras, no fueron tan características como esperábamos. En el primer gel, se depositaron en los carriles 4 μ l de muestra. Algunas bandas alcanzaron

mayor área que otras (Fig. 24) por la diferente concentración de virus en las fracciones, pero en el carril 2 y 8 la concentración del RNA no fue la suficiente para observarse en el gel. En esta primer observación no se tenía la seguridad si se trataba de RNA o si este correspondía al VST. Por lo cual se realizó la hibridación.

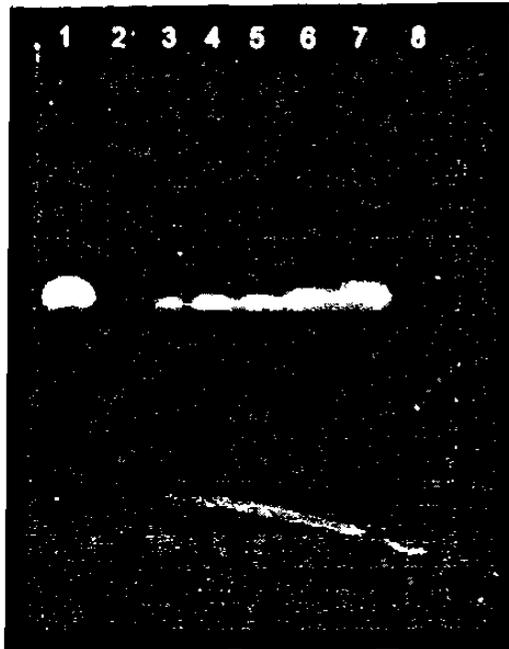


Fig. 24..Análisis del RNA obtenido de la fracciones eluidas en geles de agarosa. E volúmen depositado fue de 4 μ l por cad carril. Las muestras originales correspondían los siguientes muestreos: 1-2: Fracciones d camarones cultivados en Sonora. 3 a 6 Fracciones de purificados virales de Sinaloa. a 8: Fracciones originarias de granjas d Nayant.

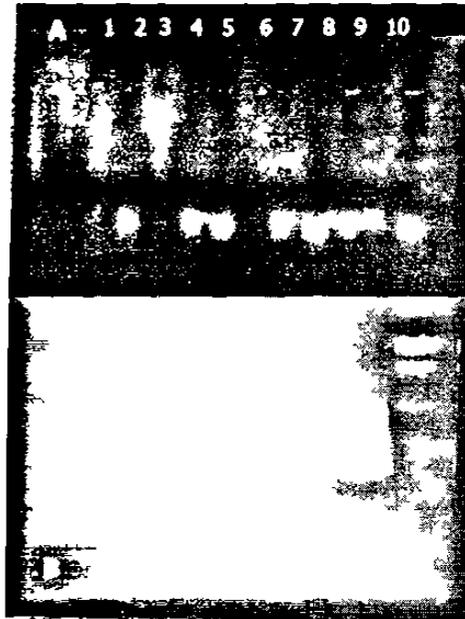


Fig. 25 A. Electroforesis realizada con el producto de extracciones correspondientes a los muestreos descritos en el texto. Fig. 25 B. Carril 1) Sin tratamiento. 2) Tratamiento con RNAasa. 3) Tratamiento con calor (100 $^{\circ}$ C) y 4) Tratamiento con DNAasa I. Las tres primeras corresponden a muestras de Nayarit, las siguientes cuatro a muestras de Sonora y las tres restantes a muestras de Sinaloa.

Para asegurar la presencia de RNA en el producto de la extracción, una muestra de 2 μ l se trataron con DNAasa I, otros con RNAasa y la tercer muestra se calentó a 100 $^{\circ}$ C/3 min. La presencia de ácidos nucleicos persistió en la muestra tratada con DNAasa I, pero no se detectó en la muestra tratada con calor o RNAasa, con lo cual se concluyó que el producto de las extracciones son RNA de cadena sencilla (Fig. 25). Lo anterior, aunado a la reacción de hibridación descritos en la Fig. 15-19 indican que el RNA analizado es del virus causante del síndrome de Taura en las granjas camaronícolas de México.

subcutícula e intestino medio anterior (Fig. 29). La hipertrofia nuclear, observada en las células dañadas, fue más común en las fases tempranas de la enfermedad, o sea, donde estos se manifestaron como cuerpos eosinofílicos. Por el contrario, los cuerpos de inclusión basofílicos correspondieron a las fases tardías, observándose la cromatina marginal y atrofia nuclear.



Fig. 29. Cuerpos de inclusión Cowdry, tipo A, producto de la multiplicación viral en el interior de los núcleos de filamentos branquiales en la fase temprana de desarrollo (flecha).

El complejo de virus que causan el síndrome, se alojaron en células de origen endotelial y mesodérmico, como se describió originalmente en brotes de Asia. En tejido conectivo adyacente a las glándulas antenales presentaron cuerpos de inclusión eosinofílicos (Fig. 30) en menor grado de infección, en comparación a los filamentos branquiales. Además de los cuerpos de inclusión se detectó necrosis masiva en epitelio cuticular y branquias, observándose la cariorexis y picnosis nuclear. En estos casos, el desarrollo de cuerpos de inclusión basofílicos, con la cromatina marginal fue la más frecuente.

Fig. 30. Tejido conectivo adyacente a las glándulas antenales con cuerpos de inclusión Cowdry.

II. CARACTERIZACION DEL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA Y LA ENFERMEDAD QUE CAUSA

1. Signos macroscópicos del causados por el WSSV: En la granja denominada Acuícola Valdéz, se observaron algunos ejemplares con las manchas blancas características, descritas en casos de Asia e India desde 1992. Estas manchas, midiéndose en exocutículas desprendidas, presentaron un diámetro de 0.1 a 3 mm (Fig. 26A) las que se presentaban aisladas. También se encontraron grupos traslapados de manchas, midiendo estas 6-8 mm. En los organismos vivos no se aprecian bién por el escaso contraste de la exocutícula, solo las que están sobre el hepatopáncreas por el color obscuro de este (Fig. 26B). En la zona de Sinaloa se detectaron estanques de *L. vannamei*, con brotes leves de mortalidad, oscilando estos entre el 2 y 10 %. Los ejemplares examinados tenían un peso promedio de 8 g, mostrando expansión de cromatóforos, resultando en una apariencia de color rojo o rosa (Fig. 27).



Fig. 26A. Manchas blancas en una exocutícula del cefalotorax de *L. vannamei*. 26B: En organismos vivos son casi inaparentes. Los ejemplares fueron detectados en Acuícola Valdéz, Guasave, Sin.

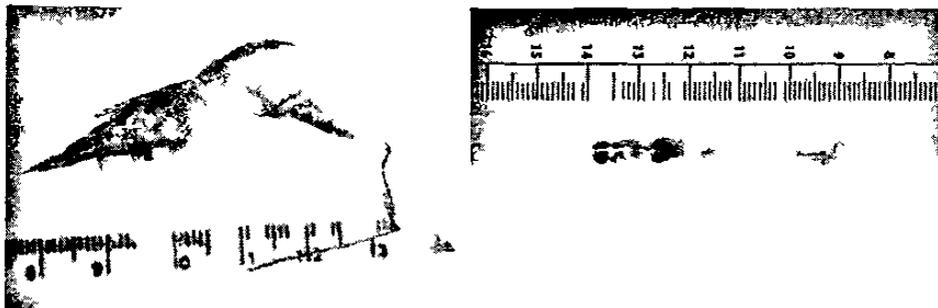


Foto 27 A y B. Ejemplares de *L. vannamei* con expansión de cromatóforos (camarón rojo o rosa), una de las expresiones clínicas de la enfermedad conocida como mancha blanca.

En resultados de campo se encontraron signos indicativos de la enfermedad, más sin embargo, la tasa de mortalidad reportadas no coincidieron con las registradas normalmente en Tailandia, Japón, India y otras localidades asiáticas, siendo estas más bajas.

Es necesario señalar que la expansión de cromatóforos no es una característica patognómica del síndrome de la mancha blanca, porque este también se presenta en el síndrome de Taura. Por este motivo se continuó con los análisis histopatológicos, para buscar al microscopio cuerpos de inclusión intranucleares (WSSV) y cuerpos de inclusión citoplásmicos de 1 a 20 μm (TSV), pues en las localidades señaladas en la Tabla 11, se observaron ejemplares (*L. vannamei*) con signos sugestivos de la fase tardía del síndrome de Taura, la cual consiste en necrosis cuticular extensiva, en cualquier parte del cuerpo o diseminada en todo el ejemplar (Fig. 28). Primero se describen la histopatología de WSSV y después del TSV.



Fig. 28. Necrosis cuticular extensiva, sugestiva de una fase tardía del síndrome de Taura.

2.- Histopatología de WSSV: Los cortes histopatológicos, teñidos con hematoxilina y eosina, presentaron los cuerpos de inclusión Cowdry, Tipo A, eosinofílicos o basofílicos e intranucleares. Estos se observaron en los tejidos branquiales, tejido conectivo esponjoso, tejido muscular y tejido epitelial de la

Las granjas Thenari, Shrimp Quality, Acuavisión y Baturi , de Sinaloa, fueron las localidades donde se detectaron los cuerpos de inclusión señalados. En Sonora y Nayarit no se encontraron cuerpos de inclusión por microscopía de luz, o signos macroscópicos sugestivos de WSSV, debido quizá a que se cultivó una especie diferente, a excepción del Ejido Francisca Felix de Sonora, donde se observó una patología sugestiva (Tabla11).

3.-Histopatología del virus del síndrome de Taura: En la Tabla 11 se señalan las localidades donde se detectó la presencia histopatológica del síndrome de Taura, descrito en la primer etapa del estudio. En esta no se realizó el proceso de purificación, debido a que en la etapa anterior ya se tenía conocimiento de la presencia de este agente infeccioso en las localidades de estudio.

En las granjas camaronícolas de Sinaloa, en nueve de ellas se *encontraron L. vannamei* infectados con TSV correspondiendo a Thenari, Shrimp Quality, Acuavisión, Baturi, Acuícola Valdés, Juventud Pesquera, Coguasin y Manuel Avila Camacho. En Matanchen, Nayarit se detectó un brote epizootico con TSV. La fase crónica fue la que más predominó en la segunda etapa del estudio (Fig. 31), afectando severamente el órgano linfoide donde se apreció necrosis (cariorexis y picnosis) con cuerpos de inclusión esféricos basofílicos.

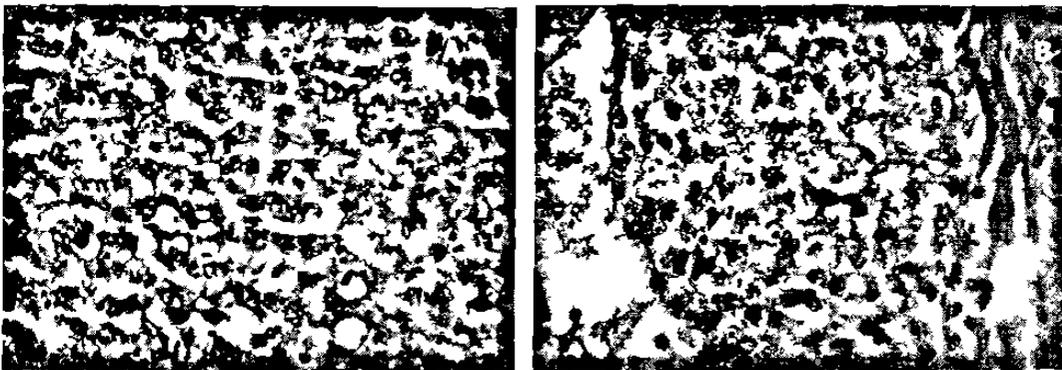


Fig. 31. Lesiones histopatológicas del virus de Taura. (A) Cariorexis extensiva, (B): Cuerpos de inclusión esféricos, citoplásmicos, característicos del TSV acompañados de necrosis severa *en L. vannamei* de Matanchen, Nayarit y otras localidades de Sinaloa señaladas en el texto.

Tabla 11. Resultados del examen histopatológico para detección del VST y WSSV.

| ORIGEN | GRANJA | ESPECIE | VST | WSSSV |
|----------------|-------------------------|---|-----|-------|
| Sinaloa | Granja el Thenari | <i>L. vannamei</i> | + | + |
| | | Jaiba silvestre (<i>Callinectes</i> sp) | - | - |
| Sinaloa | Granja Shrimp Quality | <i>L. vannamei</i> | + | + |
| Sinaloa | Granja Acuavisión, | <i>L. vannamei</i> | + | + |
| Sinaloa | Granja El Baturi | <i>L. vannamei</i> | + | + |
| Sinaloa | Acuícola Valdés | <i>L. vannamei</i> | + | - |
| Sinaloa | Explotación Acuícola | <i>L. vannamei</i> | - | - |
| Sinaloa | Juventud Pesquera | <i>L. vannamei</i> | + | - |
| Sinaloa | Granja Coguasín | <i>L. vannamei</i> | + | - |
| Sinaloa | S.C. y P, A. Mayocoba | <i>L. vannamei</i> | - | - |
| Sinaloa | Manuel Avila Camacho | <i>L. s. vannamei</i> | + | - |
| Sinaloa | Acuícola Baja Mar | <i>L. vannamei</i> | + | - |
| Sinaloa | Las Isabeles | <i>L. vannamei</i> | - | - |
| Sonora | Ejido Francisca Felix. | <i>L. stylirostris</i> | + | ± |
| Sonora | Jorge Díaz Serrano | <i>L. stylirostris</i> | + | - |
| Sonora | Héroes del Campo #2 | <i>L. stylirostris</i> | - | - |
| Sonora | Comuneros Mayos | <i>L. stylirostris</i> | + | - |
| Sonora | Estero Aquirupo | <i>L. stylirostris</i> (silvestre) | - | - |
| Nayarit | Matanchen, Nayarit | <i>L. vannamei</i> | + | - |

En la Tabla 11, se enlistan las localidades donde se observaron ejemplares con TSV en Sonora y Nayarit, los cuales, también en su mayoría, exhibieron la fase crónica del síndrome, también llamada de recuperación. Estas fueron la granja Francisca Felix, Jorge Díaz Serrano y Comuneros Mayos, pertenecientes a Sonora. En Nayarit solo se detectaron casos de TSV en Matanchen.

Cabe mencionar que al comparar los resultados de Sonora y Sinaloa, la mitad de las infecciones que se encontraron en esta segunda etapa eran mixtas, es decir, los casos de TSV eran simultáneos a los de WSSV en los ejemplares provenientes del mismo estanque y granja. Por ello, las bajas mortalidades descritas anteriormente podrían ser causadas por uno u otro virus, o ambos.

4.- Reacción en cadena de la polimerasa.

A.- Calidad del DNA purificado con DNAzol: Los primers denominados 18 S, amplificaron fragmentos de 848 pb, correspondientes a la región nucleotídica 352 a 1200 de la subunidad 18 S rRNA, altamente conservada en decápodos. La Fig. 29 muestra las bandas observadas en los geles de agarosa, a partir de extracciones de DNA de las localidades estudiadas y amplificadas con los primers 143 F y 143 R.

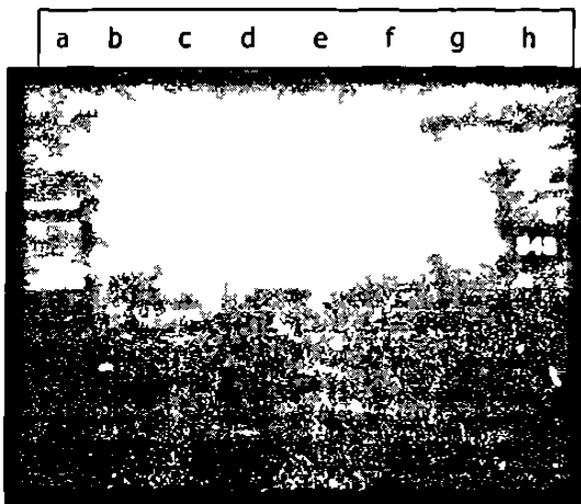


Fig. 32. Amplificación por PCR del gen 18 S en muestras de camarón. Carril a y h) DNA ladder 100, marcador de pares de bases. b-c) Ejemplares de Sonora. d-e) Ejemplares de Sinaloa y f-g) Ejemplares de Nayarit. Gel de agarosa 1 % en TAE 1X mostrando los productos de amplificación.

De esta forma, se logró determinar si los resultados negativos eran reales, o correspondían a un DNA con elevado contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos u otros contaminantes que inhibieran el procedimiento de amplificación.

B.- PCR simple o en un paso: El primer F001 y R002, que amplifican productos de 306 pares de bases, fueron los que presentaron mayor eficiencia en los procedimientos de la reacción en cadena de la polimerasa, según se deduce de los resultados de la estandarización preliminar realizada con el DNA viral utilizado como control positivo. Estos amplificaron el producto esperado de 306 pb de las muestras de DNA purificadas de ejemplares cultivados en la granja Shrimp Quality, Thenari (enviados vivos o en preservados en hielo) y en especímenes enviados en etanol 96 % procedentes de Aquavisión. En todas estas se cultiva el camarón

blanco. El control positivo se observó como una banda compacta, perfectamente definida en la posición 306, utilizando el marcador DNA ladder 100, el cual presenta bandas cada 100 pb hasta 1500, y una superior de 2072. En la Fig. 30 se observa el gel de agarosa de los productos de la reacción, teñidos con bromuro de etidio.

Fig 33. Identificación de WSSV por PCR en muestra de camarón. Carril a) Control Positivo, b-d) ejemplares de Shrimp Quality; f-g) camarón blanco d Thenari preservado en hielo y transportado vivo respectivamente, h) ejemplares de Aquavisión, i marcador de pares de bases Ladder 100.

En los canales de llamada y el estero que alimenta a los estanques de la granja Thenari, se encontraron jaibas, las cuales al ser procesadas, fueron positivos a

la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca (carril e y h de la Fig. 33). Una muestra de *L. vannamei*, cultivado en Baturi también resultó positiva al amplificarse con los mismos iniciadores F001 y R002.

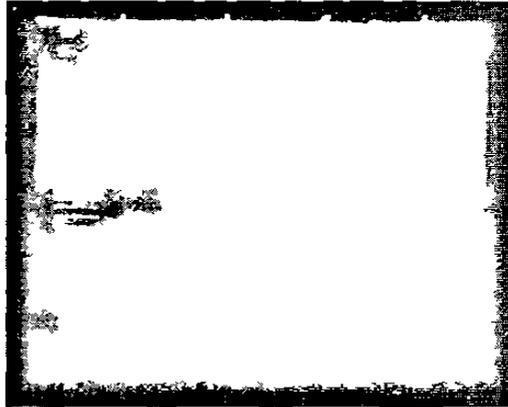
Las jaibas del entorno silvestre que presentaron productos amplificados, fueron identificadas como *Callinectes* sp.

Fig 34.: Identificación de WSSV por PCR e muestras de camarón y jaiba. Carril a) Control positivo; b) Jaiba silvestre del reservorio de Thenari; c y d): *L. vannamei* cultivado en Baturi; e Jaiba silvestre *Callinectes* sp. de esteros de Thenari; f- g): *L. stylirostris* silvestre colectado e el reservorio de Baturi; h-i): *C.allinectes* sp silvestre; j) Marcador de pares de bases del DN Ladder 100.

a b c d e f g h i j
Los iniciadores F001 y R002 amplificaron genomas virales de WSSV a partir del DNA total purificado de *Callinectes* sp. colectado en Thenari (carril c, Fig. 35,

nueva muestra), *L. vannamei* de la granja Coguasín (carril d) y Manuel Avila Camacho (carril e), preservados en etanol 96 %. El producto amplificado

Fig. 35. Identificación de WSSV por PCR en muestras de camarón *L. vannamei* y jaibas de Sinaloa. Carril a) Marcador de pares de bases DNA ladder 100, b) Control positivo. c) *Callinectes* sp. silvestre de Thenari. d) *L. vannamei* de Coguasín, e) la misma especie cultivada en Manuel Avila Camacho. f-g) Las Isabeles. h) Control Negativo. Gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5 X, teñido con bromuro de etidio.



correspondió a 306 pb, establecidas por su posición con respecto al marcador de pares de bases DNA ladder 100 (Fig. 32). En esta ocasión, las muestras se corrieron con peine de 0.8 mm de espesor, también en geles teñidos con bromuro de etidio. La localidad donde no se obtuvo producto amplificado fue en la granja Las Isabeles (carriles f y g, de la Fig. 35), procesándose dos muestras de la misma área.

C.- PCR en dos pasos y multiplex: En la estandarización de esta técnica el primer PCR se realizó con los iniciadores F001/ROO2 (amplifican productos de 306 pb), 146 F1/146 R1 (1447 pb), 6581/7632; RVPJ; 1F/1R (365 pb). En el segundo PCR se adicionaron los primers internos del producto de 1447 (146 F2/146 R2); (941 pb) y 146 F4/146R3 (775 pb). La estandarización se realizó con genomas virales de variedades o cepas tailandesas, hondureñas y muestras positivas de México descritas en la páginas anteriores.

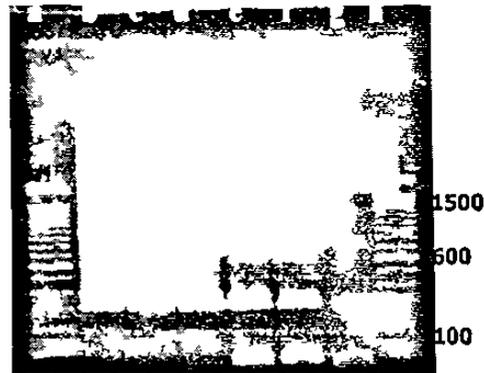
El gel que se muestra en la Fig. 36, muestra los amplicones que se resolvieron en la cepa tailandesa, situándose en las posiciones esperadas de 1447 pb; 941 pb y 775 pb, amplificado por los iniciadores F1/146 R1; 146 F2/146 R2 y

146 F4/146F3, respectivamente. También se muestran los productos de amplificación de los primers 1F y 1R y FOO1/ROO2 (306 y 365 pb).

En la cepa hondureña del virus de la mancha blanca, se apreciaron productos de 306 y 365 pb, obtenidos por la técnica de PCR múltiple o multiplex y productos de 775 pares de bases. Los productos de 1447 y 941 no se amplificaron en esta cepa.

En dos de las cepas o variedades mexicanas del virus del síndrome de la mancha blanca, correspondientes a el DNA extraído de las jaibas, *Callinectes* sp. de Thenari Sinaloa y camarones de Coguasín, ubicado en el mismo estado, los iniciadores que amplificaron productos fueron FOO1/ROO2 y 1F/1R, apreciándose los productos amplificados en las posiciones de 306 y 365 pb.

Fig. 36. Identificación de WSSV por PCR multiplex. Controles tailandeses (carril b), hondureños (c-d) mexicanos (e-f). Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.



El resto de los iniciadores mencionados anteriormente no amplificaron los productos esperados, aún variando la concentración de iniciadores, enzima *Taq*, nucleótidos o bien, la temperatura de anillamiento o aumentando el número de ciclos en el termociclador.

Las muestras positivas de Sinaloa y Sonora (descritas arriba) se procesaron por el PCR múltiple y PCR en dos pasos, demostrando que los iniciadores FOO1/ROO2 y 1F/1R amplifican de manera constante al genoma viral detectada en las localidades

mencionadas. Con respecto a los demás iniciadores, solo en una muestra se observó una banda tenue, ubicada en la posición de 775 pb. También se observaron bandas constantes de 600 pb como un producto de PCR no específico, originado por la introducción de varios iniciadores en la reacción. La Fig. 37 muestra los resultados obtenidos con la técnica descrita.

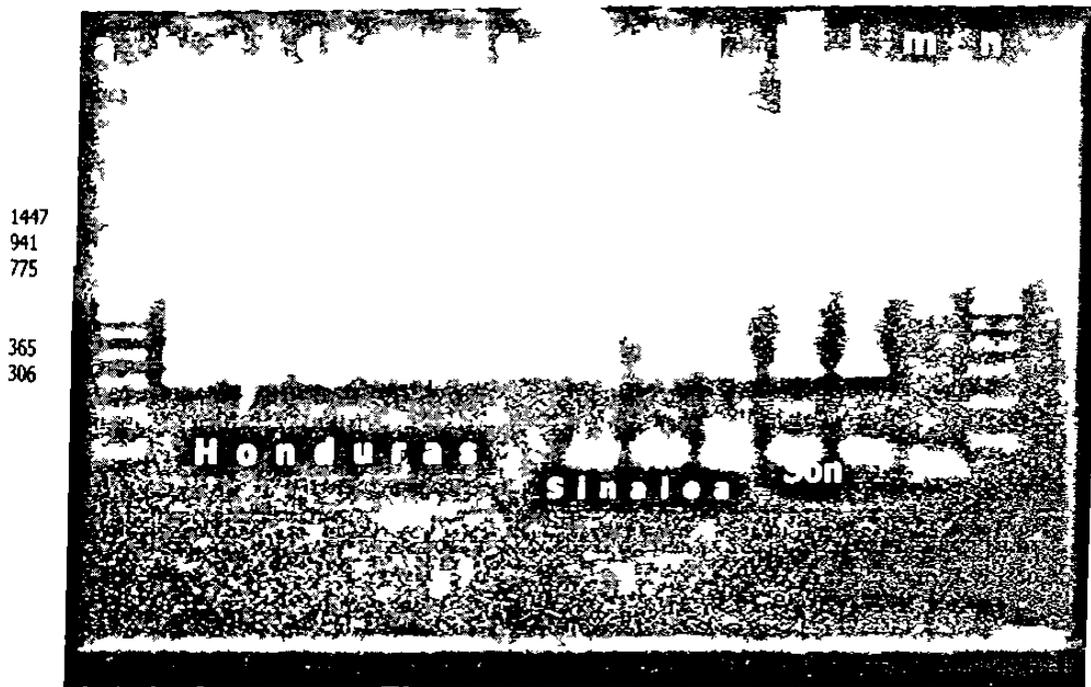


Fig. 37. PCR multiple (multiplex) realizado en la modalidad de PCR en dos pasos, donde se observan los productos de la reacción con la cepa tailandesa como control (carril b); cepa hondureña (c-g); genoma viral detectado en Sinaloa (h-k); y de Sonora (l). En el carril m) se observa el control negativo y en los carriles a) y n) el marcador de pares de bases DNA Lader 100.

Con el DNA purificado a partir de la cepa tailandesa se observaron las bandas de 1447 pb, 941 pb, 775 pb, 365 pb y 306 pb al realizar la amplificación con el juego de iniciadores descritos. El resto de los iniciadores no amplificaron los productos esperados. El DNA obtenido de camarones originarios de una epizootia hondureña, al procesarse con los mismos primers, se observaron productos de 775 pb, 365 pb y 306 pb. A diferencia de la cepa tailandesa, no se observaron productos de 1447 y 941 pb.

Con el DNA purificado de los brotes epizooticos de Sinaloa, se observaron productos de 365 y 306 pb. Para el resto de los iniciadores no se obtuvieron productos de PCR. Las muestras de Sinaloa correspondieron a las localidades de Thenari, Manuel Avila Camacho, Coguasín (banda tenue de 775) y *Callinectes* sp. del canal de llamada de Thenari (carriles h-k, Fig. 37). En el carril restante se encontró un producto amplificado que corresponde a DNA purificado de camarón *L. stylirostris*, asintomático, correspondiente a la granja Francisca Felix, en el estero Siari, Sonora (carril l, Fig. 37).

La muestra de postlarvas enviada para análisis de Ensenada de Los Cocos, Bahía de Matanchén, frente a San Blas, Nayarit, se encontró positiva para la presencia del genoma viral. La diferencia de los amplicones o productos de PCR encontrados en la muestra, fue que uno de los productos de PCR, ubicados para la cepa tailandesa y hondureña se reveló en el gel de agarosa, por lo cual consideramos que esta corresponde a otra cepa diferente de virus de WSSV presente en el país.

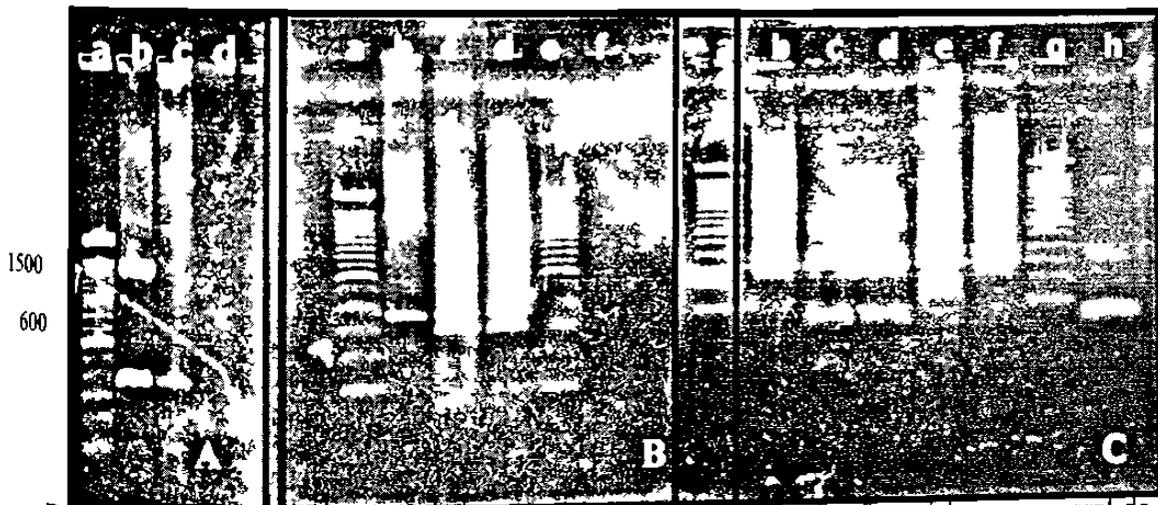


Fig. 38. Comparación de los amplicones de la cepa tailandesa, hondureña y del genoma viral de la cepa mexicana detectada en Ensenada de Los Cocos, Bahía de Matanchén. (A) Primer PCR del control tailandes (b); c) muestra de las postlarvas *L. vannamei* de Ensenada de Los Cocos; d) control negativo. (B) El producto del primer PCR del control tailandes se muestra en el carril b); en el carril c) aparece el producto del segundo PCR de la muestra de Ensenada de Los Cocos y en d) el producto del segundo PCR del control tailandes. En a) y e) se colocó el marcador DNA ladder 100; y en el carril f) el control negativo. (C) En el carril a) y g) se muestra el marcador DNA Lader 100;

b y f) producto del segundo PCR del control tailandes, c) y d) segundo PCR de la cepa hondureña; e) producto del segundo PCR del genoma viral detectado en Bahia de Los Cocos; h) control negativo. Geles de agarosa al 1% en TAE 1 X teñidos con bromuro de etidio y electroforados a 50 mA. (Ver pesos moleculares en las figuras anteriores).

En la Fig. 38 A, se muestra el primer PCR de la muestra de Bahia de Cocos, San Blas Nayarit y el segundo PCR con los iniciadores internos del fragmento de 1447 pb. Al analizar los amplicones finales del PCR en dos pasos, encontramos una particularidad importante, evidenciada por una banda de 775 pb (Fig. 38 B) que solo se había observado en la cepa hondureña y la cual no se presentó en las muestras de Sinaloa y Sonora. La comparación entre las cepas de referencia y la segunda variedad del genoma viral, presente en el país, se corroboró en la segunda reacción realizada (38 C). En esta, encontramos que la cepa tailandesa seguía presentando amplicones de 1447, 941, 775, 365 y 306 (carril b y f). En la cepa hondureña (Fig. 38 C, carriles c y d) se presentaron los amplicones de 775, 365 y 306 pb (junto con el producto extra de 600 pb que acompañó las reacciones del sistema multiplex), mientras que en la muestra de postlarvas se encontraron los amplicones señalados en las mismas posiciones que la cepa hondureña (Fig. 38 C, carril e).

Al observar estos resultados, primero se sospecho de la contaminación de las muestras en el proceso de extracción del DNA, por lo cual se reinició el análisis de las muestras con tejido diferente, proveniente del congelador. Sin embargo, los resultados fueron iguales a los señalados en la Fig 38 A-C, encontrando también, el mismo comportamiento correcto de los controles negativos utilizados.

D.- PCR en dos pasos con los ejemplares del primer muestreo: Los AN extraídos de los ejemplares colectados en los sitios del primer muestreo durante 1996-1997 y conservados en el congelador arrojaron resultados negativos para la presencia del genoma viral del WSSV. La totalidad de las muestras fueron

ρ procesadas por triplicado y analizadas con la misma técnica de PCR descrita, pero
ε en los geles no se detectaron productos amplificados de WSSV.

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

En el ámbito mundial, la camaronicultura actual es el reflejo de una práctica sostenida desde la década de los 70's. Paralelo al desarrollo de la industria del cultivo del camarón, también se han desarrollado problemas sanitarios, particularmente infecciones virales, las cuales han impactado en forma negativa la producción. De un solo virus (BP) que se conocía, afectando el cultivo de camarón en 1974 (Couch, 1974), actualmente se han descrito más de 20 anomalías atribuidas a virus, entre las cuales los más severos para la industria a nivel mundial, han sido el STV, WSSV y YHV (Lightner y cols., 1997; OIE, 1999).

En México, el cultivo del camarón como actividad comercial, se institucionalizó alrededor de 1977, desde entonces, ha ido creciendo paulatinamente para llegar a ser hoy en día una fuente permanente de empleos y generación de divisas para gran parte de la población ubicada principalmente en las zonas costeras del Pacífico Mexicano (Garmendia Nuñez, 1996).

Los resultados derivados de este estudio, al caracterizar al virus plenamente, comprueban que fue este la causa, y no la NEC (necrosis del epitelio cuticular) el que invadió a 40 de las 90 granjas camaroneras que operaron en Nayarit (PIINIAR, 1996), afectando el 50 % de la producción en ese estado (500 ton de las mil que se esperaban cosechar. A escala mundial, el Commerce Department's National Oceanic and Atmospheric Administration, estima en 9 billones de dólares, las pérdidas ocasionadas por enfermedades virales. A pesar de ello, en los países afectados no se han implementado programas de prevención y control, a excepción de Belice, donde se estableció un programa de erradicación que inició con la desinfección de estanques al finalizar el ciclo de cultivo, rotación de la tierra, dispersión de insecticidas, eliminación de carcasas y residuos en las plantas

procesadoras con excelentes resultados. Los programas de prevención y control, evitaron en Belice un impacto negativo erradicando al virus de las granjas (Dixon & Dorado, 1997).

La diseminación actual del TSV en el Continente Americano, es prácticamente cualquier sitio donde se cultiva camarón, con escasas excepciones, como son Jamaica, Puerto Rico y Venezuela, los cuales no se citan en la literatura (Hasson y cols., 1999).

En 1995, Lightner y cols. estudian muestras de *L. vannamei* cultivadas en Ecuador, Perú y Colombia, los cuales presentaban la fase pre aguda y crónica del TSV. El resultado histopatológico indicó áreas multifocales de necrosis en epitelio subcuticular de la superficie general del cuerpo, apéndices, branquias, intestino posterior, esófago y estómago. El tejido conectivo subcuticular y fibras de músculo estriado adyacente, también se encontró infectado. En las lesiones multifocales encuentran los conspicuos cuerpos de inclusión, citoplásmicos, esféricos (1-20 mm de diámetro) eosinofílicos, grisáceos o basofílicos más la presencia de núcleos picnóticos y cariorécticos. Al microscopio electrónico de transmisión observan cristales en forma de aguja en branquias, subcutícula y fibras musculares, las cuales identifican como cristales de fosfato de calcio, pero las partículas virales no las detectan en los cortes ultrafinos que realizaron, por lo cual estos investigadores se inclinan por un agente tóxico como la causa de la enfermedad. A diferencia de ellos, en este estudio, las partículas virales y los cristales de fosfato de calcio se observaron en el mismo campo en las observaciones efectuadas en 1996, con lo cual se tuvo la primer evidencia de la causa de las epizootias. Sin embargo, el estudio debía de continuar con la purificación por ultracentrifugación e inoculación de las fracciones eluidas en camarones sanos para la reproducción del cuadro clínico e histopatológico de la enfermedad. La coloración rojiza en los uropodos,

telson, pleópodos, pereopodos y antenas, corresponde a la expansión de los cromatóforos citada por Lightner y cols., en 1995. Estos investigadores revelan que en especímenes con estos signos se presenta una necrosis focal del epitelio, en los bordes de los apéndices. Esto marca una fase preaguda de la enfermedad, tal como se percibió en los ejemplares muertos en el bioensayo. Hasson y cols (1995) logran caracterizar el agente etiológico mediante estos procedimientos de muestras de camarones originarias de Ecuador y Hawaii. Los virus purificados median de 26 a 34 nm en las fracciones de muestras de Hawaii y de 24 a 34 en las de Ecuador. Los bioensayos les permitieron reproducir la fase preaguda y la crónica, encontrándose lesiones en órgano linfoide, similares a las que se describen en este estudio. La densidad flotante de las partículas según los resultados de Hasson y cols. (1995) fue de 1.337 g ml^{-1} , y en comparación a la realizada en el material procedente de Sonora, Sinaloa y Nayarit, que fue de 1.31 a 1.34 g cm^{-3} (índice de refracción de 1.363, 1.364, 1.367 y 1.365), permite definir al agente causal como el mismo virus descrito por ellos, aunque las medidas realizadas al microscopio electrónico nos permiten establecer un diámetro de 31-32 nm.

En los bioensayos del experimento observamos supervivencia del 50% hasta el octavo dpi, difiriendo notablemente de los resultados de Hasson y cols. (1995) quienes observan sobrevivencias cercanas al 13 y al 17 % en solo 4-5 dpi. Otra de las diferencias observadas es que el pico de mortalidad fue del 73 al 87%, presentándose este entre el tercer y cuarto día que duró el bioensayo.

Los inóculos empleados fueron tomados de las bandas de los gradientes de sucrosa y CsCl, a diferencia del procedimiento empleado por Hasson y cols.(1995) quienes emplean en uno de los bioensayos un inóculo crudo, homogeneizando y centrifugando a 30,000 rpm.

Suponemos que esta diferencia se debe al origen de la cepa de virus, pues ellos emplean una cepa ecuatoriana de *L. vannamei* infectada, inoculándola en organismos SPF de la misma especie. En este bioensayo, los camarones no provenían de laboratorios, sino que eran camarones silvestres por lo cual no presentaron tanta sensibilidad al virus como la observada por los autores mencionados, o bien, por la concentración de los virus en el inóculo.

Bonami y cols. en 1997, describen también sus resultados con respecto a la caracterización del agente viral del síndrome de Taura a partir de muestras ecuatorianas y Hawaianas. Encuentran partículas icosaédricas de 31 a 32 nm de diámetro, las cuales concuerdan con las medidas realizadas en las observaciones de las fracciones eluidas de muestras de camarones de Sinaloa, Sonora y Nayarit realizadas en este estudio. La densidad flotante calculada por los autores en la caracterización del síndrome en muestras ecuatorianas y hawaianas fue de 1.338 ± 0.001 g/ml, difiriendo ligeramente de las lecturas encontradas en los virus purificados procedentes de muestras del Pacífico mexicano ($\rho = 1.31$ a 1.34 g cm³). Hasson y cols (1995) consideran que el TSV debe ubicarse en la familia Picornaviridae o Nodaviridae, mientras que Bonami y cols. (1997) lo ubican en Picornaviridae. De acuerdo a nuestras referencias bibliográficas, Picornaviridae presenta un diámetro de 24-30 nm con una densidad de 1.33 a 1.45 g/cm³; en cambio, Nodaviridae mide 29-30 nm y su densidad oscila de 1.30 a 1.35 g/cm³ (Trudel & Payment, 1993), por ello, nos inclinamos a respaldar la sugerencia de ubicarlo en los Nodaviridae. Bonami y cols. (1997) con la reacción de orcinol demuestra que el genoma del virus está constituido por RNA, mientras que la reacción de la difenilamina permaneció negativa. El análisis en geles de agarosa al 1 % en condiciones desnaturizantes determina una longitud de 9 kb comparada con marcadores de ss RNA y fue sensitivo a la digestión con MBN y RNasa A, pero resistente a la digestión con DNasa. Resultados similares encontramos en los

resultados descritos al realizar las digestiones con DNasa I y RNasa en el genoma extraído con Trizol. Los picos de mortalidad acumulativa obtenida en los bioensayos ascendieron al 60 % con el grupo inoculado con los virus de Hawaii y 64 % en el grupo ecuatoriano, extendiéndose a siete días los experimentos de bioinfectividad.

El análisis de proteínas en los geles de poliacrilamida entre el estudio de Bonami y cols (1997) y el descrito aquí fue la diferencia mayor encontrada. Estos investigadores determinan la presencia de tres polipéptidos mayores de 24, 40 y 55 kD y un polipéptido menor de 58 kD En los geles realizados en las fracciones eluidas, encontramos en cambio, cuatro polipéptidos mayores, de 154, 124, 72 y 56.9 kD y dos menores, de 54 y 38 kD.

En 1997, Hasson y cols. estudian la distribución geográfica del TSV en el Continente Americano por histopatología e hibridación *in situ*. Analizan 98 muestras de las cuales, 74 (76 %) fueron positivas a la sonda, encontrando la reacción en las células subcuticulares y en órgano linfoide, donde al parecer, el TSV es secuestrado durante la fase crónica de la infección. Veinticuatro de las muestras no reaccionaron con la sonda de hibridación, debido a la hidrólisis ácida causada por el fijador Davidson que tenía un pH de 3.5 a 4.0. Solucionan este problema utilizando un fijador neutro (pH 6-7), llamándolo "RNA-friendly" (RF). Las muestras analizadas fueron colectadas desde Brasil hasta South Carolina y Texas, USA en el periodo comprendido de 1991-1996. También en 1999, Hasson y cols. reportan la presencia del TSV en muestras de Guayas, Ecuador (1992); Tumaco, Colombia y Tumbes, Perú (1993); Pernambuco, Brasil; Colombia; Ecuador; El Salvador; Guatemala; Honduras; Ohau, Hawaii y Florida, EUA. En muestreos de 1995 lo detectan en Belice, Ecuador, Salvador, Honduras, México (Sonora, Sinaloa, Guerrero, Chiapas); Nicaragua, Panamá y Texas, EUA. En los muestreos de 1996 lo

ubican en Belice, Costa Rica, Guatemala, México (Sonora, Sinaloa y Tamaulipas), Panamá y EUA (Texas) por ensayos de hibridación e histopatología. Estos encuentros apoyan fuertemente la distribución geográfica del TSV, indicando que el mismo virus o cepas estrechamente relacionadas son las responsables de las epizootias que han ocurrido en el Continente Americano desde 1992. Así mismo, indica que el TSV es responsable de muchas, si no todas, las epizootias de México y Texas durante 1995 y que estas epizootias no fueron el resultado de "la enfermedad similar al síndrome de Taura", citando a Jiménez (1996) o bacterias intracelulares, pues la existencia de estas dos enfermedades aún no ha sido científicamente establecido y documentado. Bajo esta perspectiva, concordamos completamente con Hasson y cols. (1999), al encontrar las partículas virales, confirmando los resultados mediante observaciones al microscopio electrónico, pases sucesivos en bioensayos, histopatología e hibridación, inclusive, el análisis del genoma viral. De hecho, los resultados de este manuscrito indican la existencia de brotes en el presente ciclo de cultivo (Octubre de 1999) causados por el mismo TSV en granjas localizadas en Nayarit y Sinaloa, principalmente, pero no tan severos como los que causó en 1996-1998.

Hasta 1999, la enfermedad más importante en la industria camaronícola del Continente Americano es, sin lugar a dudas, el síndrome de Taura. Lotz (1997) estudia el efecto del tamaño del hospedero (*L. vannamei*) con respecto a la virulencia del TSV, como una táctica para disminuir el efecto adverso de las infecciones en los cultivos. En los experimentos efectuados observa que el hospedero no aumenta su tolerancia al virus al aumentar su talla de 1 a 30 g.

Hasta la fecha en que concluyó la segunda etapa, las mortalidades por el TSV en el Continente Americano no han concluido, aunque si podemos asegurar que el impacto es menor, debido probablemente a la mayor resistencia al patógeno,

generada por el camarón, pero también a que la práctica de cultivar postlarvas silvestres ha disminuido dramáticamente, cultivándose por lo general, larvas certificadas producidas en laboratorios bajo condiciones sanitarias controladas, libres del virus de Taura.

Aunque Hasson y cols. indican en sus reportes de 1995 la identificación del agente etiológico del síndrome de Taura, en camaronicultivos de Ecuador y Hawaii, así como Bonami y cols., en 1997 (a partir de muestras de camarón de los mismos países mencionados), consideramos conveniente continuar con este estudio, iniciado en 1996, al no conocer, en las granjas de México, el agente de las epizootias de la enfermedad a la cual se le llamaba "síndrome del camarón rojizo" o también, NEC (necrosis del epitelio cuticular), pues este cuadro clínico también es causado por bacterias del género *Vibrio*, sustancias tóxicas (pesticidas), florecimiento de algas tóxicas, toxinas cianobacterianas o bacterias intracelulares (Brock y cols., 1994).

Con respecto a la segunda etapa de estudio, desarrollada en el primer semestre de 1999, este se inició al tener conocimiento de la presencia de camarones de color rojo o rosa en la estanquería de las granjas ubicadas en Los Mochis, Sinaloa, aunado a mortalidades significativas que solo afectaban a *L. vannamei*, más no en estanquería vecina donde se cultivaba a *L. stylirostris*. Inicialmente se sospecho de la fase aguda del síndrome de Taura. Cabe aclarar, que en los ciclos de cultivo de 998 no se presenciaron brotes epizooticos similares a los que causa el síndrome de Taura y se consideraba esta enfermedad como un suceso pasado. Al iniciar los muestreos de material biológico en Los Mochis, Guasave y Culiacán, detectamos algunos ejemplares con las "manchas blancas", pero otros, presentaban también necrosis generalizada en la exocutícula.

Los resultados indicaron la presencia de WSSV, confirmándose por la reacción en cadena de la polimerasa la identificación preliminar realizada por la apariencia macroscópica de las manchas blancas en campo y los cuerpos de inclusión intranucleares Cowdry, tipo A en el estudio histopatológico.

Los resultados del cuadro clínico, histopatología y reacción en cadena de la polimerasa coincidieron en cinco de los sitios de muestreo, siendo estos la granja Thenari (camarón cultivado y jaibas silvestres *Callinectes* sp.), Shrimp Quality, Acuavisión, Baturi. La muestra de la granja Manuel Avila Camacho, *L. stylirostris* procedente de Sonora y la de Bahía de Matanchen se diagnosticaron positivas por PCR. La presencia de este virus en México no es tan sorprendente si tomamos en cuenta los casos de Nicaragua y Honduras (Lara, 1999) ocurridos en el Golfo de Fonseca, afectando principalmente a *L. stylirostris* de origen silvestre. Este fue el primer reporte de la presencia del WSSV en las costas del Pacífico del Continente Americano, porque los primeros tres casos diagnosticados sucedieron en Texas, Carolina del Sur y en el Zoológico Nacional de Washington. EUA durante 1995. En las dos primeras epizootias se reportaron pérdidas en los cultivos de *L. setiferus* y en la tercera a los cangrejos de río *Procambarus* spp. y *Orconectes punctimanus* (Nunan y Lightner, 1997). Las infecciones experimentales de un aislado tailandés, realizadas por Lightner y cols. (1998) en especies americanas de camarones indicaron también, infecciones de curso severo en *L. setiferus* y *L. vannamei*, con mortalidades acumulativas del 100 %, aunque en *Fa aztecus* y *Fa duorarum* mostraron cursos moderados y resistencia a la infección, respectivamente.

La presencia del virus del síndrome de la mancha blanca es una pregunta difícil de responder, aunque existe una evidencia real predominante. Al estudiar productos alimenticios congelados, en supermercados de los Estados Unidos de Norteamérica (se importaron 119 millones de toneladas de crustáceos asiáticos)

representados por seis exportadores asiáticos, se encontraron infectados por WSSV y por el virus de la cabeza amarilla (este último causa serias epizootias en Asia) por las técnicas de PCR, hibridación y MET. Incluso, algunas de las muestras positivas, resultaron con virus infecciosos al probarse en bioensayos experimentales.

Aunque este estudio confirma la presencia del WSSV en el país, no nos atrevemos a asegurar que las mortalidades registradas corresponden a infecciones de este virus al encontrarse infecciones mixtas con TSV. La cepa o aislado geográfico que se encuentra en Sinaloa y Sonora amplifica de manera constante con los primers 1F/1R y FOO1/ROO2 que amplifican productos de 365 y 306 pb .

El primer par de primers fueron diseñados por Kim y cols. (1998) a partir de virus purificados de *P. japonicus* en Corea realizado por Kim y cols (1998). De acuerdo a los resultados de estos autores, obtiene cientos de clonas a partir del genoma viral de las fracciones purificadas. El análisis de las secuencias nucleotídicas mostró que ninguna de las clonas mostró considerable homología con las de otros virus conocidos. Indica que el virus nombrado como baculovirus asociado con el WSBV es un nuevo virus que causa enfermedad seria en camarones.

El segundo par de primers fue diseñado por Klimpel (1999, com. pers.) a partir de una cepa tailandesa que causa efectos desbastadores en peneidos.

En cambio, el aislado que se detectó en Nayarit, amplificó también con los primers descritos Lo y cols (1996) quien purificó las partículas virales a partir de *P. monodon* en Tailandia.

El comportamiento de ambos aislados geográficos o cepas, al amplificarse por PCR es diferente, por lo cual suponemos que ambos tienen diferente origen. Una alternativa que sugerimos es la introducción de crustáceos congelados al país, realizados por cadenas de restaurantes u hoteles, debido a que antes de 1999 no existían restricciones para la importación de estos productos. Los desechos del procesamiento como son el corte, procesamiento sanitario y reempacado de los productos definitivamente van al mar o se realizan en áreas cercanas a la costa, constituyendo una fuente de infección para los crustáceos silvestres o cultivados, tal como ha sido demostrado en Estados Unidos de Norteamérica (Lightner y cols., 1998). Otra de las alternativas es el arribo del camarón asiático, *P. monodon* a aguas mexicanas por mar, tal como ocurrió en el sistema lagunar costera Huizache-Camainero, Sinaloa, reportado en 1994 por Córdova Murueta y cols. Ambas alternativas constituyen serios objetivos que deberán analizarse en otros estudios.

La variabilidad en las secuencias nucleotídicas de los virus que constituyen al complejo WSSV ha obligado a los investigadores a purificar por ultracentrifugación las partículas virales de las entidades geográficas donde han ocurrido mortalidades en masa. Por esta razón existen diversos pares de primers para la detección del virus. Cabe mencionar que el protocolo de Lo y cols. (1996) es el que se utiliza más comúnmente para estandarizar los nuevos protocolos de la reacción en cadena de la polimerasa, aunque no siempre detectan la presencia del genoma viral, como ocurrió en los casos del país. Incluso, en la literatura se le denomina con diferentes nombres como son: Virus de la necrosis baculoviral hipodérmica y hematopoyética (IHHNVB, Huang y cols., 1994); Virus en forma de varilla de *Penaeus japonicus* (RV-PJ, Inouye y cols., 1994; Takahashi y cols., 1994); Baculovirus mesodérmico y ectodérmico sistémico (SEMBV, Wongteerasupaya y cols., 1995) y Baculovirus de la mancha blanca (WSBV). Actualmente se le ha

llamado WSSV para uniformizar el complejo de virus con un solo nombre (Lightner, 1996), pero también porque en el 6° Reporte ICTV los Nudivaculovirinae y el género NOB (Non-Occluded Baculovirus, solicitado por Lo y cols., 1997) no se enlistaron, permaneciendo en la lista de virus de invertebrados sin asignación genérica (Murphy y cols., 1995).

La amplia diversidad de hospederos que presenta el WSSV incluyó inicialmente a especies de peneidos asiáticos, como *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *Marsupenaeus (P.) japonicus*, *Fenneropenaeus chinensis (P. orientalis)*, *Fe. Penicillatus*, *Fe indicus*, *Fe merguiensis*, *Trachypenaeus curvirostris* y *Metapenaeus ensis* (Wongteerasupaya, 1995; Lo y cols. 1996; Lightner y cols., 1997). En el Hemisferio Occidental el rango de hospederos incluye a *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris* con infecciones naturales y a *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *L. setiferus*, *Farfantepenaeus aztecus* y *Fa. duorarum* (Lightner y cols., 1997; Wang, 1999). Las diferencias entre los casos asiáticos y los del Continente Americano son que en Asia las manchas blancas del exoesqueleto son muy prominentes, alcanzando estas de 0.5 a 3 mm de diámetro; la coloración rosa o rojiza del cuerpo en casos avanzados de la infección, letargia, pérdida del exoesqueleto, disminución repentina en el consumo de alimento, afecta a juveniles de todas las edades, siendo más severo entre el primer y segundo mes de la siembra, las cepas inducen mortalidades del 80-100 % y son escasas las que ocasionan mortalidades menores al 20 %. A diferencia, en el Hemisferio Occidental las manchas blancas son difíciles de observar, aún en infecciones experimentales, por lo cual, la ausencia de estas no es una regla para excluir una infección, requiriéndose de la confirmación por métodos más sensitivos para un diagnóstico definitivo (Lightner y cols., 1997). En los casos revisados personalmente por el autor, de ejemplares provenientes de Nicaragua y Honduras, el material presentó manchas blancas diminutas en escasos ejemplares, difíciles de detectar a simple

vista (0.18 a 2 mm), solas o en aglomerados. El color rojizo del cuerpo fue similar a los casos causados por el TSV. La mortalidad en esta ocasión (Febrero-Marzo de 1999) alcanzó del 60-80 %. En los casos estudiados de las granjas mexicanas, los brotes de mortalidad fueron cortos y se sucedieron entre el primer y segundo mes de la siembra. Las mortalidades observadas por estanque fueron menores del 20 %.

Fue muy importante, en el desarrollo de la segunda etapa, revisar el manuscrito de Sudha y cols. (1998) porque diferencia tres tipos de epizootias asociadas al síndrome de la mancha blanca en *P. monodon* y *Fe indicus* cultivados en la India y que coinciden con los casos ocurridos en México. Menciona que es bien conocido que los signos clínicos son no específicos y por lo común, reflejan un imbalance funcional de los órganos blanco. Los signos dependen del tejido blanco de la infección, la carga de patógenos, severidad de la infección y respuesta del hospedero. Diferencia el tipo I de epizootias porque los camarones en cultivo presentan manchas blancas predominantes, las mortalidades significativas tienen un periodo de duración de 7-10 días en cultivos con 60-90 días promedio. Este tipo de epizootias se presentó en subadultos y abarcó al 60 % de las epizootias estudiadas. La forma de la enfermedad predominante fue la aguda. La epizootia tipo II la caracteriza porque los camarones presentan predominantemente el cuerpo rosa o rojizo. La duración de la mortalidad más significativa ocurrió en un periodo de 2-3 días afectando a camarones juveniles donde se manifestó la fase preaguda. El total de epizootias afectadas abarco al 10% de las estudiadas, en cultivos de menos de 30 días. En contraste, al tipo III lo separa de los dos primeros porque los camarones (subadultos) en cultivo están saludables, las mortalidades más significativas abarcan periodos de 60-90 días y la forma de enfermedad que se presenta es la crónica. El porcentaje de epizootias correspondió al 30 %, con respecto al total. Los casos registrados en México, de

acuerdo al punto de vista de Sudha y cols. (1998), quedarían ubicados en el tipo II por presentar los ejemplares el cuerpo rojizo o rosa y afectar a juveniles entre el primer y segundo mes de la siembra, según la información obtenida en mayoría de las granjas que se visitaron en Sinaloa y que resultaron positivas (Thenari, Acuavisión, Baturi). El caso detectado en Sonora por PCR ocurrió en ejemplares asintomáticos, sanos y en sitios donde no se presentaron brotes, en contraste a los casos observados en la misma especie de hospederos cultivados en Honduras y Nicaragua y a los resultados descritos por Lightner y cols. (1997) donde menciona que en *P. stylirostris* (al igual que en postlarvas y juveniles de *P. vannamei*, *P. setiferus*, *P. aztecus* y *P. duorarum*) al ser infectados experimentalmente desarrollaron la enfermedad con los inoculos del virus, debido probablemente por la diferencia en las cepas o aislados virales.

Wang y cols. (1999) estudia seis aislados geográficos por infecciones experimentales. Los aislados provenían de China, India, South Carolina, Texas y el Zoológico Nacional en Washington y amplifica la cantidad de virus inoculándolo primero en *L. setiferus* por inyección o en el alimento. El primer ensayo lo realiza en 700 postlarvas (PL 30) SPF de *L. vannamei* y el segundo en 75 *Fa duorarum* y 15 SPF de *L. vannamei*. La mortalidad acumulativa de *L. vannamei* alcanzó el 100 % después de retarlos con los seis aislados geográficos de WSSV. De los aislados, el de Texas causó mortalidades más rápido que el resto. El aislado viral de los langostinos fue el más bajo. El contraste más marcado se encontró en *Fa duorarum* donde se presentaron mortalidades del 35-60% y varió de un aislado a otro. Interesantemente, en esta especie, el aislado de Texas fue también el más virulento. De acuerdo al punto de vista de los autores, sugieren que existen diferencias en la virulencia de los aislados y que la susceptibilidad varía con la especie y estadio de vida del hospedero, con lo cual estamos de acuerdo al revisar los casos del país y compararla con los descritos en la literatura.

Es claro, desde nuestro punto de vista, que existen en el país dos cepas o aislados geográficos distintos, según lo señalan los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa. Uno de ellos ubicado en cultivos de Sinaloa y Sonora y el segundo en las costas de Matanchen. Este último aislado, al obtenerse de un lote de postlarvas silvestres, presentaron productos de PCR de los que describe Lo y cols. (1996) y que son similares a los que se observaron en los controles de Honduras, con bandas de 775, 306 y 365 pb: Estos lotes de postlarvas finalmente no se cultivaron (en respuesta a la norma oficial NOM-001-PESC-1999) por lo cual no tenemos datos de sobrevivencia o mortalidad acumulativa. En los casos de Honduras y Matanchen, los productos que no amplificaron en la reacción fueron el de 941 y 1447, pero que si amplifican regularmente en el control tailandés utilizado en las reacciones.

En Marzo del presente año, el gobierno mexicano a través de la SEMARNAP, emitió la norma NOM-EM-PESC-1999 con la cual, se restringen las importaciones de crustáceos e insumos para evitar la introducción de los virus mancha blanca y cabeza amarilla al país, debido a la mortalidad masiva ocurrida en Centroamérica a inicios de 1999 y a los casos registrados en los Estados Unidos de Norteamérica desde 1995. Por ello, el Centro Nacional de Sanidad Acuícola, es uno de los cuatro laboratorios aprobados por la SEMARNAP para analizar las muestras de las compañías importadoras de camarón para consumo humano, sementales para producción de larvas, postlarvas para cultivo e insumos alimenticios para los cultivos como es la *Artemia*. De hecho, a la actualidad, el Laboratorio de Patología Molecular del CNSA es el único con las instalaciones, equipo y personal capacitado donde se realiza la técnica de PCR en el país.

LITERATURA CITADA

- Adams, JR; JR Bonami. (Editors). 1991. Atlas of Invertebrate Virus. CRC Press, Boca Raton, FL. 684 pp.
- Adams, JR; JT McClintock. 1991. Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses. Part 1. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. Pp.87-204 *in* Adams, JR and JR Bonami Editors. Atlas of invertebrate viruses, Chap VI. CRC Press, Boca Raton, FLA.
- Alain, R, P Berthiaume. 1993. Immunocytochemical Staining in Electron Microscopy. *In:* Payment, Pierre, J. and M Trudel. Methods and Techniques in Virology. Chap 18. pp. 167.
- Alday-Sanz, V; TW. Flegel. 1997. The risk of introducing yellowhead and whitespot viral infections from Asia to the Americas. *In:* Proceedings , Fourth Ecuadorian Aquaculture Conference, 22-27 October 1997, Guayaquil, Ecuador.
- Anton, IA; DP. Lane. 1986. Non-structural protein 1 of parvoviruses: Homology to purine nucleotide using proteins and early proteins of papoviruses. Nucleic Acids Res. 14, 7813.
- Asian Shrimp Culture Council 1994. SEMBV- an emerging viral threat to culture shrimp in Asia. Asian Shrimp News. 20, 2-3.
- Boehringer Mannheim. Corporation. 1989. DNA Labeling and Detection Nonradioactive. Applications Manual, Biochemical Products. Biochemica:. 1-62
- Bonami, JR; B. Trumper, J Mari, M Brehelin, D V. Lightner. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. J of General Virology. 71:2657-2664.

- Bonami, JR, DV. Lightner. 1991. Unclassified viruses of crustacea. Atlas of Invertebrates Viruses. Adams, JR. and JR Bonami (Eds). CRC Press, Inc. Pp. 597-622.
- Bonami, JR; DV Lightner, RM Redman, BT Poulos. 1992. Partial characterization of a togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimps. Diseases of Aquatic Organisms. 14:145-152.
- Bonami, JR; KW. Hasson, J Mary, BT Poulos, DV Lightner. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. J. of General Virology. 78: 313-139.
- Boonyaratpalin, S; K. Supamattaya, S. Direkbusaracom, U. Aekpanithanpong, C. Chantanachooklin. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of Yellow Head Disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Gyobyo Kenkyu. 28: 103-109.
- Boyd, C. 1994. Taura Syndrome Workshop: executive summary, January, 21-22, 1994. University of Arizona, Tucson, Arizona, USA. pp.148.
- Brock, J.A; DV Lightner. 1990. Diseases of Crustacea. Diseases caused by microorganisms. . Vol 3, Pp 1-245 in O. Kinne, editor. Diseases of Marine Animals. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Brock, J; K Main. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute. Makapu Point, Honolulu, HI. 241 pp.
- Brock, JA.; R Gose, DV Lightner, K Hasson. 1995. An Overview on Taura Syndrome, an Important Disease of Farmed *Penaeus vannamei*. Pp 84-94 in C.L. Brodway and J.S. Hopkins, editors. Swimming through troubled water, proceedings of the

- special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Bruce, LD. 1993. Application of recombinant techniques for detection of the penaeid shrimp baculovirus, BP. U.M.I. The University of Arizona Tesis. 1-111 pp.
- Caetano-Anollés, G; PM. Gresshoff. 1994. Staining nucleic acids with silver, an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes*. 45: 13-18.
- Cai, S; J Huang, C Wang, X Song, X Sun, J Yu, Y Zhang, C. Yang. 1995. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. *J. Fish. China*. 19: 112-117.
- Campbell, J and G Gerard. 1994. Proteinase K stability. *Focus*. 16: 1-22
- Chen, SN. 1995. Current state of shrimp aquaculture in Taiwan. Pp. 29-34 *in* C.L Broadway and JS Hopkins, editors. *Swimming through troubled water. Proceedings of the special session on shrimp farming. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.*
- Córdova-Murueta, JH; MJ Acosta Ruíz, D. Voltolina. 1994. Primer registro de *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 en las costas de Sinaloa, México. *Rev. Inv. Cient. Ser. Cienc. Mar. UABC*. 5: 31-32.
- Couch, JA. 1974. An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: Ultrastructure, prevalence and enhancement. *J. Invertbr. Pathol.* 24, 311-331
- Couch, JA. 1981. Viral Diseases of invertebrates others than insects. Pp 127-160 *in* EW Davidson, editor. *Pathogenesis of invertebrates microbial diseases*. Allanheld, Osmum, Totowa, NJ, USA.

- Dixon, H; J Dorado. 1997. Managing Taura syndrome virus in Belize: A case study. *Aquaculture Magazine*/June. 30-42.
- Dumas, B; M Jourdan, AM Pascaud, M Bergoint. 1992. Complete nucleotide sequence of the cloned infectious genome of *Junonia coenia* Densovirus reveals an organization unique among Parvoviruses. *Virology*. 191: 202-222.
- Durand, S; DV Lightner, LM Nunan, RM Redman, JC Mari, JR Bonami. 1996. Application of gene probes as diagnostic tool for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27: 59-66.
- Durand, S; DV. Lightner, R M Redman, JR Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 29:205-211.
- Francki, RIB; CM Fauquet, DL Knudson, F Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses. *Archives of Virology*, Springer-Verlag, Viena, p 450.
- Garmendia Nuñez, E. 1996. El Cultivo de camarón (Antecedentes y Situación Actual). *Rev. Unión. Organo de Información y Consulta*. Nov. 1996. Año 1. Nº 1: 14-16.
- Giraud, C; G Devauchelle, M Bergoin. 1992. The Densovirus of *Junonia coenia* (Jc DNV) as an Insect Cell Expression Vector. *Virology*, 186: 207-218.
- Glocker, B; R Richard, JR Hoopes, L Hodges, GF. Rohrmann. 1993. *In vitro* transcription from Baculovirus late gene promoters: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts prepared from infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Virology*. 27:3771-3776.

- Hasson, K.W.; DV Lightner, BT Poulos, RM Redman, BL White, JA Brock, J.R. Bonami. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23:115-126.
- Hasson, KW; H Aubert, RM Redman, DV Lightner. 1996. A new RNA friendly fixative for the preservation of penaeid shrimps samples for virological assays using cDNA probes. *Journal of Virological Methods*. 66: 227-236.
- Hasson, KW; DV Lightner, J Mari, JR Bonami. 1997. The geographic distribution of Taura syndrome virus in the Americas: determination by histopathology and *in situ* hybridization using TSV-Specific cDNA Probes. IV Simposio Centroamericano de Acuicultura. Honduras. pp. 154-155.
- Hasson, KW; DV. Lightner, J Mari, JR Bonami, BPoulos, LL Mohny, R M Redman, J A Brock. 1999. The geographic distribution of Taura syndrome virus (TSV) in the Americas: determination by histopathology and *in situ* hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*. 171:13-26
- Huang, J; XL Song, J Yu, CH Yang. 1994. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis - pathology of the shrimp explosive epidermic disease. Abstracts. Yellow Sea Fishery Research Institute, Qingdom, P.R. China.
- Inouye, K; S. Miwa, N Oseco, H Nakano, T Kimura, K Momoyama, M Hiraoka. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology*. 29:149-158.
- Jimenez, R. 1992. Síndrome de Taura (Resumen). *Acuicultura del Ecuador*.1: 1-16.

- Jiménez, F. 1996. Acciones para prevenir enfermedades. Memorias del Foro International de Camaronicultura 1996. Agosto 1-3, 1996. Mazatlán, Sinaloa, México.
- Jory, D. 1998. Gold Shrimp Farming in 1997. Aquaculture Magazine Buyer's Guide '98. pp. 32-41.
- Kanchanaphum, P; C Wongteerasupaya, N Sitiddiilokratana, V Boonsaeng, S Panyim, A Tassanakajon, B Withyachumnarnkul, TW Flegel. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. 34: 1-7
- Karunasagar, I; SK Otta, I Karunasaagar. 1997. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. Aquaculture. 153: 9-13
- Kasornchandra, J.; S Boonyaratpalin, T Itami. 1998. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. Aquaculture 164: 243-251.
- Kim, W; G Abele. 1990. Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18s rRNA nucleotide sequences. J. Crust. Biol. 10:1-13.
- Kim, CK; PK Kim, SG Sonn, DS Sim, MA Park, MS Heo, TH Lee, JD Lee, HK Jun and KL Jang. 1998. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in Penaeid shrimp. Journal of Fish Disease. 21:11
- Kimpel, K. 1999. Aquatic Diagnostic Labs. San Diego, CA, USA. Com. pers.

- Krol, R M; WE Hawkins, RM Overstreet. 1990. Reo-like virus in white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): co-occurrence with *Baculovirus penaei* in experimental infections. *Diseases of aquatic Organisms*. 8:45-49.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- LeBlanc, BD; RM. Overstreet. 1990. Prevalence of *Baculovirus penaei* in experimentally infected white shrimp (*Penaeus vannamei*) relative to age. *Aquaculture*, 87:237-242.
- LeBlanc, BD; RM. Overstreet, JM. Lotz. 1991. Relative susceptibility of *Penaeus aztecus* to *Baculovirus penaei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 22:173-177.
- Lara, C. 1999. Los cinco vectores mas importantes en la propagacion del virus de la mancha blanca y el virus de la cabeza amarilla y su control en el cultivo de los camarones del genero *Penaeus*. *Com. Pers. Hidrocultivos de la Costa, Cartagena, Coombia*. Marzo de 1999.
- Lester, RJG; A Doubrovsky, JL Paynter, SK Sambhi, JG Atherton. 1987. Light and electron microscope evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeus plebejus*. *Dis Aquat. Org.* 3: 217.
- Lightner, DV. 1984. A review of the diseases of cultures penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. Pp 57-80 in M. Sharif, R. Subasinghr and JR Arthur, editors. *Diseases in Asian Aquaculture*. Manila, Philipinas.
- Lightner DV. 1985. A review of the diseases of cultured penaeid shrimp and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. Pp 79-103 in *Proceedings of*

the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/shrimps, Y Yaki, JH Primavera and JA Llobrera,. editors. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Iloilo, Philippines.

Lightner, D V. 1992. Shrimps virus diseases: diagnosis, distribution and management. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA. Pps. 79-103

Lightner, DV. 1993. Diseases of penaeid shrimps. Pp. 393-486 *in* In: JP McVey, editor. CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture. Second Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Lightner, DV. 1996. Epizootiología y diseminación de dos virus de los camarones penaeidos en las Américas y su impacto sobre el comercio internacional. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15: 579-602.

Lightner, DV. 1996. A Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. The World Aquaculture Society Press, Boca Raton, FL.

Lightner DV; RM Redman. 1981. A Baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. J. Invertebr. Pathol. 24: 311

Lightner, DV; RM Redman, TA Bell, JA Brock. 1983b. Detection fo IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. J. World Maricul. Soc. 14: 212-225.

Lightner, DV; RM Redman, TA Bell. 1983. Observation on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the Baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture. 32: 209-233.

- Lightner, DV; RM Redman, TA Bell. 1983. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal Pathology* 42: 62-70.
- Lightner, DV; RM Redman. 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 45, 47-53.
- Lightner, DV; RM Redman. 1989. *Baculovirus penaei* in *Penaeus stylirostris* (crustacea: decapoda) cultured in Mexico: unique cytopathology and a new geographic record. *Journal of Invertebrate Pathology* 53. 137-139.
- Lightner, DV; RR Williams, TA Bell, RM Redman, LA Perez A. 1992a. A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES mar. Sci. Symp.* 194: 97-105
- Lightner, DV; RM Redman, TA Bell, RB. Thurman. 1992b. Geographic dispersion of the viruses IHHN, BV and HPV as a consequence of transfers and introductions of penaeid shrimp to new regions for aquaculture purposes. Pp. 155-173 *in* A Rosenfield, and R Man editors. *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*. University of Maryland System, College, Park, Maryland, USA.
- Lightner, DV; RM Redman, JP Bonami. 1992. Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Diseases of Aquatic Organisms*. 13: 235-239
- Lightner, DV; BT Poulos, L Bruce, RM Redman, L Nunan, C Pantoja, J Mari, JR Bonami 1994. Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHHNV and HPV, and the Baculoviruses MBV and BP, US. *Marine Shrimp Farming Program* 10th

- Anniversary Review, Gulf Coast Research Laboratory Special Publication. Ocean Springs, Mississippi: Gulf Research Reports. No. 1, pp. 59-85.
- Lightner, DV; LS Jones, GW Ware. 1994. Proceedings of the Taura syndrome workshop: Executive Summary, Submitted Reports, and Transcribed Notes. Jan. 21-22, Univ. Arizona, Tucson.
- Lightner, DV; RM Redman, KW Hasson, CR Pantoja. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure Diseases of Aquatic Organisms. 21: 53-59.
- Lightner, DV; RM Redman, BT Poulos, LM Nunan, JL Mari, K. Hasson. 1997. Status of the major virus diseases of concern to the shrimp farming industries of the Americas: Known distribution, host and available detection methods. Proceedings of the IV Central American Symposium on Aquaculture, April 22-24, 1997. Tegucigalpa, Honduras. 36-48.
- Lightner, DV; RM Redman, BT Poulos, LM Nunan, JL Mari, KW Hasson. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 16:146-160.
- Lightner, DV; KW Hasson, BL White, M Redman. 1998. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. Journal of Aquatic Animal Health. 10: 271-281.
- Lo, CF; JH Leu, CH Ho, CH Chen, SE Peng, TT Chen, CM Chou, PY Yeh, CJ Huang, HY Chou, CH Wang, GH Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms. 25:133-141.

- Lo, CF; CH Ho, CH Chen, KF, L, YL Chiu, PY Yeh, SE Peng, HC Hsu, HC Liu, CF Chang, MS Su, CH Wang, GH Kou. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms*. 30: 53-72.
- Lo,CF; CH Ho, SE Peng, CH Chen, HC Hsu, YL Chiu, CF Chang, KF Liu, MS Su, CH Wang, GH Kou. 1998. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27: 215-225.
- Loh, PC; Y Lu and JA Brock. 1990. Growth of the penaeid shrimp virus infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in a fish cell line. *J. Virological Methods* 31: 189-196.
- Lotz, JM. 1997. Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Disease of Aquatic Organisms*. Vol 30: 45-51.
- Lu, Y; PC Loh, and JA Brock. 1989. Isolation, purification and characterization of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) from penaeus shrimp. *Journal of Virological Methods*. 26: 339-344.
- Lu, Y; E C B. Nadala Jr., JA Brock, PC Loh. 1991. A new virus isolate from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-infected penaeid shrimps. *Journal of Virological Methods* 31: 189-196.
- Luedman, RA; DV Lightner. 1992. Development of an in vitro primary cell culture system from the penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 101: 205-211.

- Mari, J; JR Bonami, DV Lightner. 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *Journal of General Virology* 74: 2637-2643.
- Mari, J; JR Bonami, DV Lightner. 1998. Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 33: 11-17.
- Murphy, FA; CM Fauquet, DHL Bishop, SA Gabrial, AW Jarvis, GP Martelli, MA Mayo, MD Summers. 1995. Classification and nomenclature of virus. *Arch. Virol.* 10: 1-586.
- Nakano, H; H Koube, S Umezawa, K Momoyama, M Hiraoka, K Inouye and N Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathology*. 29: 135-139.
- Nunan, LM; DV Lightner. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Virological Methods*. 63: 193-201.
- Nunan, LM; BT Poulos, DV Lightner. 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*. 160: 19-30.
- Nunan, LM; BT Poulos, DV Lightner. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected shrimps. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34: 87-91.

- OIE (Office International des Epizootias). 1999. Diseases of crustaceans *in* International Aquatic Animal Health Code- 1999. Office International de Epizooties, 12 rue Prony, 75017 Paris, Francia. Section 2.3.
- Overstreet, RM; KC Stuck, RA Krol, WE Hawlins. 1988. Experimental infection with *Baculovirus penaei* in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) as a bioassay. Journal of the World Aquaculture Society. 19: 175-187.
- Owens, L; S De Beer, J Smith. 1991. Lymphoidal parvo-like virus in Australian prawns. Diseases of Aquatic Organisms. 11: 129.
- Park, J; YS Lee. 1996. Patological study of a infectious lymphoid organ necrosis virus infection in penaeid shrimp (*Penaeus orientalis*). J. Vet Res 36: 1013-1016.
- Park, JH; YS Lee, Y Lee. 1998. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. Diseases of Aquatic Organisms. 34: 71-75.
- Peng, SE; CF Lo, CH Ho, CF Chang, GH Kou. 1998. Detection of White spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. Aquaculture 164: 253-262.
- Pérez-Farfante, I; B. Kensley. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle. 175: 1-123.
- PINIAR Periodismo Moderno. Nayarit Opina. Octubre 1996.
- Rosenberry, B. 1993. Taura syndrome hits in Ecuador, again. Shrimp News International. 18:3- 6

- Rosenberry, B. 1994a. Update on Taura syndrome in Ecuador. *Shrimp News International*. 19: 2-4.
- Rosenberry, B. 1994b Taura syndrome ravages Ecuador. *Shrimp News International*. 19: 10-12.
- Rosenberry, R. 1997. *World Shrimp Farming. Annual Report*, Shrimp News International.
- Sambrook, J; EF Fritsch, T Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory,; Cold Spring Harbor, NY.
- Sano, T; T Nishimura, K Oguma, K Momoyama, N. Takeno. 1981. Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan. *Fish Pathol.* 15: 185-191.
- SEMARNAP (Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca). 1996. Informe anual de actividades. Programa Nacional de Sanidad Acuícola. Dirección General de Acuicultura.
- SEMARNAP (Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca). 1998. Informe anual de actividades. Programa Nacional de Sanidad Acuícola. Dirección General de Acuicultura.
- Simms, D; PE Cizdziel, P Chomczynski. 1993 TRIzol: A new reagent for optimal single-step. *Focus* 15: 99-102.
- Smullen, S. 1997. Viruses could affect shrimps stocks and Industry. NMFS Seeks Public input to ecological risk assessment. NOAA 97-R142.

- Sudha, PM; CV Mohan, KM Shankar, A Hegde. 1998. Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture* 167: 95-101.
- Summers, MD; GE Smith. 1987. A Manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin. No. 1555, 56 p.
- Supamattaya, K; RW Hoffmann, S Boonyaratpalin, P Kanchanaphum. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 32: 79-85.
- Takahashi, Y; T Itami, M Kondo, M Maeda, R Fijii, S Tomonga, K Supamattaya, S Booyaratpalin. 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathology*. 29: 121-125.
- Takahashi, Y; T Itami, N Suzuki, J Kasornchandra, K Supamattaya, R Khongpradit, S Boonyaratpalin, M Kondo, K Kawai, R Kusuda, I Hirono, T. Aoki. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of Bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *Journal of Fish Diseases* 19: 399-403.
- Trudel, M; P. Payment. 1993. Ultracentrifugation. Pp. 67-82 in M. Trudel and P. Payment, editors. *Methods and Techniques in Virology*. Chap 8. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Tsing, A; JR Bonami. 1987. A new viral disease of the shrimp, *Penaeus japonicus* Bate. *J. Fish Dis.* 10: 139-141.

- United States Department Of Commerce 1997. National Oceanic and Atmospheric Administration. National Marine Fisheries Service. Silver Spring, Maryland 20910. Office of International Affairs. F/LA2:RW/DW. IFR-92/27.
- Vialard, JE; C D Richardson. 1993. The 1,629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhendrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein. Journal of Virology. 45:5859-5866.
- Voytas, D. 1993. Resolution and recovery of large DNA fragments. In:Current Protocols in Molecular Biology Supl. 27, Cap. 1. *Escherichia coli*, Plasmids, and bacteriophages. Section 2.5 a.
- Volkman, LE; BA Keddie. 1990. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. Seminars in Virology. 1:249-256.
- Voyles, BA. 1993. The Biology of Viruses. Mosby-Year Book Inc. St. Louis Missouri. 386 pp.
- Wang, CH; CF Lo, JH Leu, CM Chou, PY Yeh, HY Chou, MC Tung, CF Chang, MS Su, GH Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Disease of Aquatic Organisms. 23:239-242.
- Wang, YC; CF Lo, PS Chang, GH Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. Aquaculture. 146: 221-231.

Wang, QB; I White, RM Redman, DV Lightner. 1999. *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus durarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 170: 179-194.

Weber, KO; M Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 224: 4406-44012.

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

Wongteerasupaya, C; JE Vickers, S Sriurairatana, GL Nash, A Akarajamorn, V Boonsaeng, S Panyim, A Tassanakajon, B Withyachumnarnkul, TW Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cell of ectodermal and mesodermal orogin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21: 69-77.

