III. MATERIALES Y MÉTODOS.

III.1. Muestras: su origen, características y lugar de análisis.

Se colectaron un total de 17 muestras, en 14 granjas, siete de las cuales se obtuvieron en los Municipios de San Blas y Rosamorada al Norte de Nayarit; el resto en Sinaloa: siete en los Municipios de El Rosario y Mazatlán al sur y tres más en los Municipios de Navolato y Culiacán, al centro del Estado (Figura 1).

Figura 1. Ubicación geográfica de las muestras. NAY: zona norte de Nayarit; SIN S: zona sur de Sinaloa y SIN C: zona centro de Sinaloa.

La colecta de las muestras se realizó entre finales de noviembre y principios de diciembre del 2000, tomando en cuenta la ubicación y la accesibilidad de las granjas. En cada muestra se seleccionaron diez organismos de *L. vannamei* de los estanques que presentaron algún síntoma o comportamiento que pudiera considerarse como patológico. Primeramente se extrajeron cerca de 200 µl de hemolinfa a cada organismo, que se almacenaron en criotubos (dos por muestra) de 1,200 µl, los cuales contenían aproximadamente 50 µl de citrato de sodio al 10% como agente anticoagulante (De la Rosa-Vélez, *com pers.*).

De la Rosa-Véles, Jorge. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Ensenada.

Inmediatamente después se le extirparon los pleópodos colocándolos en trozos de papel aluminio etiquetados con el número de muestra y el número del organismo. De esta manera se obtuvieron diez juegos de pleópodos por muestra que, junto con los dos criotubos, fueron congelados con hielo seco y mantenidos en esas condiciones hasta que arribaron al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Ensenada, en donde se mantuvieron a una temperatura de –70° C hasta el momento de su análisis.

A cada muestra se le asignó una clave que incluye en sus primeros dos dígitos el año de colecta, en las primeras tres letras el estado, y para el caso de Sinaloa, una cuarta letra que indica la región sur (S) o centro (C) del estado, seguido por un tercer dígito que representa el número de granja por zona y separado por un guión, un último dígito que indica el número de muestras por granja (Tabla I).

Tabla I. Claves asignadas a las muestras. *Primeros dos dígitos:* año de colecta; *primeras tres letras:* estado de colecta; *cuarta letra:* región del estado de colecta (únicamente Sinaloa); *tercer dígito:* número de granja por región; y separado por un guión el *cuarto dígito:* el número de muestra por granja.

Norte de Nayarit	Sur de Sinaloa	Centro de Sinaloa
00 NAY 4-1	00 SIN S 3-1	00 SIN C 3-1
00 NAY 5-1	00 SIN S 5-1	00 SIN C 4-1
00 NAY 6-1	00 SIN S 5-2	00 SIN C 5-1
00 NAY 7-1	00 SIN S 6-1	
00 NAY 7-2	00 SIN S 6-2	
00 NAY 8-1	00 SIN S 7-1	
00 NAY 9-1	00 SIN S 8-1	

III.2. Pruebas de PCR y RT-PCR.

Estas pruebas se realizaron para determinar la presencia de WSSV, IHHNV, TSV y YHV a partir del análisis de las muestras de la hemolinfa.

III.2.1. Extracción de ácidos nucleicos.

Las extracciones de ADN y ARN (Anexos 1a y b, respectivamente) se realizaron a partir de las muestras de hemolinfa para las pruebas de PCR y RT-PCR y de tejido (pleópodos) para las de hibridación, basándose en la técnica de extracción de isotiocianato de guanidina-etanol-cloformo (Sambrook *et al.*, 1989).

III.2.2. Controles empleados en las pruebas de PRC, RT-PCR y DAV.

En cada una de estas pruebas fue necesario incluir junto con las muestras los controles positivo (+) y negativo (-) (Tabla II), utilizando material genético de organismos seguramente infectados y seguramente no infectados, respectivamente.

Tabla II. Características de los controles positivo (+) y negativo (-) empleados en la detección de los virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoiética (IHHNV), del síndrome de Taura (TSV) y del síndrome de la cabeza amarilla (YHV).

Síndrome	Control		Características
WSSV	(+)	**pWS**	Control positivo (ADN) proporcionado por el Laboratorio de diagnóstico de enfermedades virales de la empresa Maricultura del Pacífico. S.A. de C.V.
	(-)	**nWS**	Control negativo del Basic Primer Kit for White Spot Virus (ver Anexo 5b).
		cn	Organismo 6 de la muestra 00 SIN S 3-1.
IHHNV	(+)		Controles internos del DAV.
	(-)	**cn**	Organismo 6 de la muestra 00 SIN S 3-1.
TSV	(+)	**pTS1**	Organismos infectados experimentalmente por el Dr Jan Robert Bonami.
		pTS2	Control positivo del TSV Basic Primer Kit for RT-PCR (ver Anexo 5b).
	(-)	**nTS**	Control negativo del TSV Basic Primer Kit for RT-PCR (ver Anexo 5b).
		cn	Organismo 6 de la muestra 00 SIN S 3-1.
YHV	(+)	**pYH**	Organismos infectados experimentalmente por el Dr Jorge De la Rosa-Vélez.
	(-)	**cn**	Organismo 6 de la muestra 00 SIN S 3-1.

- **cn** Organismo seleccionado por las características de la muestra la cual resulto libre de patógenos específicos (SPF) para WSSV, IHHNV, TSV y YHV, en análisis previos.

III.2.3. Detección de WSSV.

La presencia de WSSV se determinó primeramente usando como molde extractos de ADN total obtenidos de las muestras de hemolinfa. Para esto se utilizaron los *primers* (WSPV28 F/R) que fueron diseñados en la aplicación *Primer Select* del programa *DNA Star* y fueron elaborados por *Invitrogen™ Life Technologies* con la secuencia WSPV28 F (*forward*): 5´- CTC GCT TGC CAA TTG TCC TGT TA - 3´ y WSPV28 R (*reverse*): 5´- ATC CGC ATC TTC TTC CTT CAT CTG - 3´, los cuales están diseñados para amplificar un fragmento de 461 pb del gen VP28 (secuencia disponible en NCBI *Gene Bank* No. de acceso: AF380842) el cual codifica para una de las proteínas de la cápside. Estas amplificaciones se realizaron con las características y bajo las condiciones descritas en el anexo 2a.

De manera simultanea se realizó la detección de este virus empleando como molde las muestras de hemolinfa, con el DAV, siguiendo los procedimientos e indicaciones de este juego de reactivos comercial (Anexo 2b).

III.2.4. Detección de IHHNV.

La presencia de IHHNV fue evaluada empleando como molde las muestras de hemolinfa, con el juego de reactivos comercial DAV desarrollado por SKULD&TECH (Anexo 2b).

III.2.5. Detección de TSV y YHV.

La detección de estos virus se realizó a partir del ARN total extraído de las muestras de hemolinfa. Las RT-PCR se realizaron con el kit comercial Titan One Tube RT-PCR System (TOT) (No. de Cat: 1 855 476) de Laboratorios Roche, empleando las metodologías que incluyen los *primers* desarrollados por Nunan *et al.* (1998b) y por Tang y Lightner (1999) para TSV y YHV, respectivamente (Anexos 2c y 2d).

III.2.6. Análisis de los productos de PCR y RT-PCR.

Los productos de PCR para la detección de WSSV en los que se empleó el juego de primers (WSPV28 F/R) y los productos de RT-PCR para la detección de TSV y YHV, fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos amplificados se estimó comparando su posición con los marcadores de peso molecular que fueron de 500 pb para WSSV y de 250 pb para TSV y YHV.

Los productos de PCR para la detección de WSSV e IHHNV obtenidos con el DAV, fueron analizados por la técnica de hibridación *dot-blot* descrita en el protocolo del juego de reactivos comercial (Anexo 2b).

III.3. Pruebas de hibridación.

Estas pruebas se realizaron para evaluar el grado de prevalencia en las muestras que resultaron positivas a la presencia de TSV y YHV. Con esta finalidad los organismos de cada muestra se analizaron por separado.

III.3.1. Obtención y cuantificación de las sondas moleculares.

Las sondas de TSV y YHV fueron obtenidas (Anexo 3a) empleando el juego de reactivos comercial DIG-High Prime (No. Cat.: 1 585 606) y se cuantificaron (Anexo 3b) con el DIG Control Teststrips (No. Cat.:1 669 966) y el DIG Quantification Teststrips

(No. Cat.: 1 669 958), todos de Boehringer Mannheim, obteniendo cantidades de ADNc marcado con DIG aproximadas a los 40 y 400 $ng \cdot \mu l^{-1}$, respectivamente.

III.3.2. Hibridación de la "gota inmovilizada sobre soporte sólido" (*dot-blot*).

Las hibridaciones se realizaron a partir de homogenizados de tejido tratados y no tratados con 40 µl de proteinasa k, también se emplearon extractos de ARN y productos de RT-PCR. Los homogenizados se prepararon macerando 40 mg de tejido en 200 µl de H_2O libre de ARNasas y 200 µl de amortiguador de desnaturalización, luego se centrifugaron a 13,500 *g* durante 30 minutos para eliminar los residuos y finalmente se recuperó el sobrenadante. En el caso de los extractos de ARN y los productos de RT-PCR se obtuvieron como se detalla en los anexos 1b y 2c y 2d, respectivamente.

Las muestras se fijaron en membranas de nylon (Boehringer Mannheim) cargadas positivamente, calentando a 68° C los homogenizados de tejido y los extractos de ARN y a 100° C en el caso de los productos de RT-PCR, todos durante 10 minutos. Inmediatamente después se enfriaron colocándolos en hielo por un periodo de tiempo igual, con la intención de abrir (en el caso del ADNc) o romper estructuras secundarias (en el caso de ARN) de los ácidos nucleicos y de esta manera ponerlos a disponibilidad para ser hibridados por la sonda.

Para eliminar por completo cualquier tipo de solvente contenido en las muestras, las membranas se colocaron en un horno (Thomas Scientific) a 60° C por periodos que variaron entre 55 y 60 minutos (sólo en casos extremos hasta 150), quedando sobre la membrana únicamente los ácidos nucleicos, los cuales inmediatamente se fijaron a la membrana exponiéndolos durante 3 minutos bajo luz UV en un crosslinker UPV (Mod. CL 1000).

La prehibridación se realizó colocando la membrana en el amortiguador High SDS a 42° C durante 4 horas; posteriormente, se realizó la hibridación, renovando este amortiguador y adicionando 30 ng de la sonda específica (que en conjunto forman la solución de hibridación), manteniendo las mismas condiciones de temperatura por 16 horas. Al finalizar la hibridación, se recuperó la solución de hibridación la cual pudo ser reutilizada por varias ocasiones.

Posteriormente, se realizó una serie de lavados con SSC (2X y 0.5X) + 0.1% de SDS y con el amortiguador de lavado (amortiguador 1 + 0.3% de Tween 20) para eliminar por completo el exceso de sonda. Seguidamente las membranas se colocaron en la solución de bloqueo (amortiguador 2), para bloquear todas aquellas superficies de la membrana que no

fueron cubiertas por los ácidos nucleicos contenidos en las muestras y evitar de esta manera que al agregar la solución de anticuerpos (Anti-DIG-AP 1:2,000 en el amortiguador 2) cuya función es unirse a la DIG con la que fueron marcadas las sondas, se unieran a la membrana y causaran problemas de tinción inespecífica.

Se realizó otro lavado con el amortiguador 1 para eliminar los anticuerpos que pudieron haber quedado libres y se sometió a un último lavado con el amortiguador de detección (amortiguador 3), para preparar el pH de la membrana y finalmente para revelar los resultados de la hibridación se colocó la membrana en la solución de detección en completa oscuridad (ver detalles en anexo 4).