IV. RESULTADOS.

IV.1. Pruebas de PCR y RT-PCR.

IV.1.1. WSSV.

En las pruebas de PCR tradicionales, las cuales fueron reveladas por electroforesis, se encontró la presencia de este virus en cinco de las 17 muestras analizadas, de las cuales tres pertenecen al norte de Nayarit (00 NAY 5-1, 00 NAY 6-1 y 00 NAY 7-2) y el resto (00 SIN C 3-1 y 00 SIN C 4-1) al centro de Sinaloa (Figura 2 y tabla III).

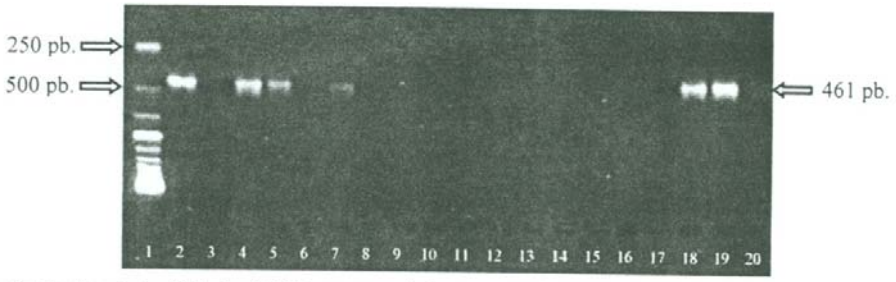

Figura 2. Productos de la PCR de WSSV en un gel de agarosa al 1.5%. De izquierda a derecha, *pozo 1:* marcador molecular de 250 pb; *pozo 2:* control positivo: pWS1; *pozo 3:* control negativo: nWS; *pozos del 4 al 20* en ese orden las muestras **00 NAY 5-1**, **00 NAY 6-1**, 00 NAY 7-1, **00 NAY 7-2**, 00 NAY 8-1, 00 NAY 4-1, 00 NAY 9-1, 00 SIN S 5-1, 00 SIN S 5-2, 00 SIN S 6-1, 00 SIN S 6-2, 00 SIN S 7-1, 00 SIN S 3-1, 00 SIN S 8-1, **00 SIN C 3-1**, **00 SIN C 4-1**, 00 SIN C 5-1. Negritas: muestras infectadas.

Por otro lado, en los resultados proporcionados por el DAV se encontró que WSSV estuvo presente en ocho muestras en las que se incluyen las cinco anteriores, otra en el norte de Nayarit (00 NAY 7-2) y dos más (00 SINS 5-1 y 00 SINS 5-2) en el sur de Sinaloa (Figura 3 y tabla III).

IV.1.2. IHHNV.

Este virus de acuerdo con los resultados del DAV fue el más abundante de todos ya que su presencia se detectó en 13 de las 17 muestras en las cuales se incluyen las siete del norte de Nayarit (00 NAY 4-1, 00 NAY 5-1, 00 NAY 6-1, 00 NAY 7-1, 00 NAY 7-2, 00 NAY 8-1 y 00 NAY 9-1), tres del sur de Sinaloa (00 SINS 6-1, 00 SINS 6-2 y 00 SINS 7-1) y tres más (00 SINC 3-1, 00 SINC 4-1 y 00 SINC 5-1) del centro de Sinaloa (Figura 3 y tabla III).

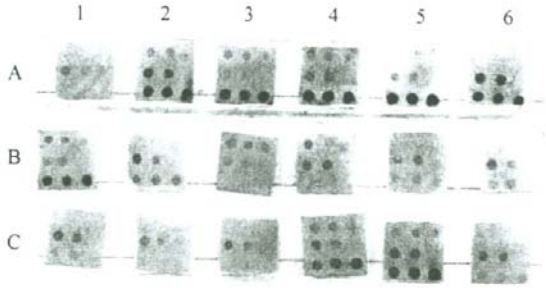

Figura 3. *Dot-blots* a partir del *WSSV Dual Aqua Vir IHHNV* (DAV). Puntos superiores: indican presencia de WSSV. Puntos centrales: indican la validez de la prueba (controles positivos para la PCR e hibridación *dot-blot*). Puntos inferiores: indican presencia de IHHNV. *Celda 1A:* control negativo: hemolinfa del cn; celdas 2A-6A: muestras **00 NAY 5-1**, **00 NAY 6-1**, **00 NAY 7-2**, 00 NAY 7-1 y 00 NAY 4-1); *celdas 1B-6B:* muestras **00 NAY 8-1**, 00 NAY 9-1, **00 SIN S 5-1**, **00 SIN S 5-2**, 00 SIN S 6-1 y 00 SIN S 6-2; *celdas 1C-6C:* muestras 00 SIN S 7-1, 00 SIN S 3-1, 00 SIN S 8-1, **00 SIN C 3-1**, **00 SIN C 4-**1 y 00 SIN C 5-1. Negritas: muestras infectadas por WSSV; subrayado: muestras infectadas por IHHNV.

IV.1.3. TSV.

En el caso de TSV, también fueron cinco las muestras infectadas, una en el norte de Nayarit (00 NAY 5-1), dos en el sur de Sinaloa (00 SIN S 5-2 y 00 SIN S 6-1) y dos más (00 SIN C 4-1 y 00 SIN C 5-1) en el centro de Sinaloa (Figura 4 y tabla III).

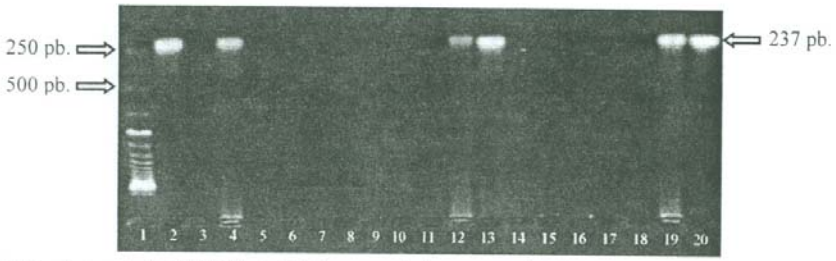

Figura 4. Productos de la RT-PCR de TSV en un gel de agarosa al 1.5%. De izquierda a derecha, *pozo 1:* marcador molecular de 250 pb; *pozo 2:* control positivo: ARN del pTS1; *pozo 3:* control negativo: nTS; *pozos del 4 al 20:* en ese orden las muestras **00 NAY 5-1**, 00 NAY 6-1, 00 NAY 7-1, 00 NAY 7-2, 00 NAY 8-1, 00 NAY 4-1, 00 NAY 9-1, 00 SIN S 5-1, **00 SIN S 5-2**, **00 SIN S 6-1**, 00 SIN S 6-2, 00 SIN S 7-1, 00 SIN S 3-1, 00 SIN S 8-1, 00 SIN C 3-1, **00 SIN C 4-1**, **00 SIN C 5-1**. Negritas: muestras infectadas.

IV.1.4. YHV.

Este fue el virus menos frecuente, ya que su presencia se detectó solamente en dos muestras, una en el norte de Nayarit (00 NAY 4-1) y la otra (00 SIN C 5-1) en el centro de Sinaloa (Figura 5 y tabla III).

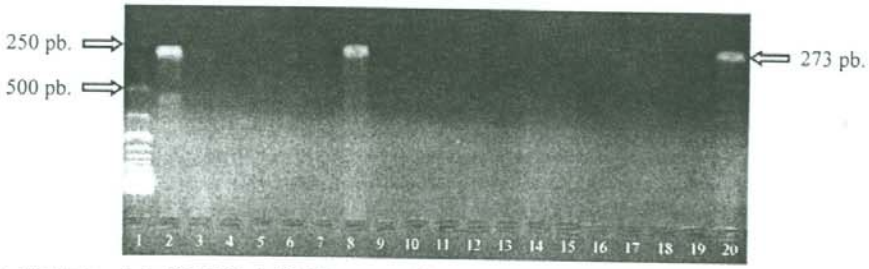

Figura 5. Productos de la RT-PCR de YHV en un gel de agarosa al 1.5%. De izquierda a derecha, *pozo 1:* marcador molecular de 250 pb; *pozo 2:* control positivo: ARN del pYH; *pozo 3:* control negativo: ARN del cn; *pozos del 4 al 20:* en ese orden las muestras 00 NAY 5-1, 00 NAY 6-1, 00 NAY 7-1, 00 NAY 7-2, **00 NAY 8-1**, 00 NAY 4-1, 00 NAY 9-1, 00 SIN S 5-1, 00 SIN S 5-2, 00 SIN S 6-1, 00 SIN S 6-2, 00 SIN S 7-1, 00 SIN S 3-1, 00 SIN S 8-1, 00 SIN C 3-1, 00 SIN C 4-1, **00 SIN C 5-1**. Negritas: muestras infectadas.

IV.2. Pruebas de hibridación *dot-blot.*

IV.2.1. TSV.

Los resultados de estas pruebas empleando como molde homogenizados de tejido fueron poco satisfactorios. Por esta razón se analizaron otras alternativas, como la de digerir con Proteinasa K los homogenizados de tejido, así como también hacer las hibridaciones a partir de extractos de ARN del control pTS1 y productos de RT-PCR del control pTS2, siendo este último el único que resultó positivo.

Tomando en cuenta estos resultados, se realizó una prueba de RT-PCR para cada uno de los organismos de la muestra 00 SIN S 6-1, en cuyos resultados se observó claramente que la mayoría, a excepción de los organismos 3 y 7, estaban infectados por TSV y que el número 8 era el que presentaba el mayor grado de infección (Figura 6).

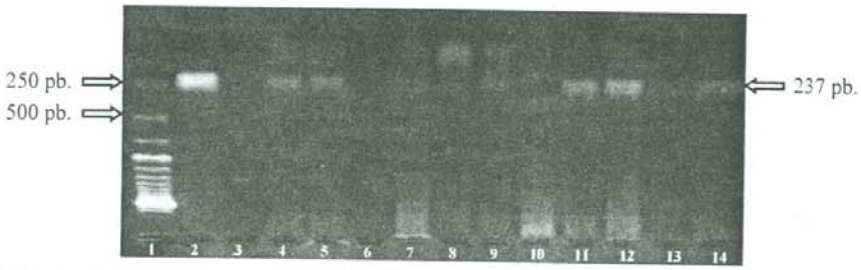

Figura 6. Resultados de la RT-PCR de TSV de los organismos de la muestra 00 SIN S 6-1, en un gel de agarosa al 1.5%. De izquierda a derecha, *pozo 1:* marcador molecular de 250 pb; *pozo 2:* control positivo: ARN del pTS; *pozo 3:* control negativo: nTS; *pozos del 4 al 10:* en orden ascendentes los organismos del 1 al 7; *pozos 11 y 12:* organismo 8 en dos diferentes concentraciones de templete (1/100 y 1/1000); *pozos 13 y 14:* organismos 9 y 10.

Después de confirmar con la prueba de RT-PCR la presencia de TSV en 8 de los 10 organismos de la muestra 00 SIN S 6-1, se realizó una última prueba de hibridación (Figura 7 y tabla III) en la cual se empleó como templete los productos de las reacciones de RT-PCR (Fila 3). También se fijaron homogenizados de tejido y extractos de ARN del organismo número 8 de la muestra en cuestión (de la celda A2 a la D2, en 1 y 2 µl, respectivamente) y como controles se emplearon dos productos de RT-PCR, uno de estos amplificado a partir del control pTS2 (Celda A1) y el otro del control pTS1 (Celda B1), a demás de un extracto de ARN (celda C1), homogenizados de tejido, tratado (Celda D1) y no tratado (Celda E1) con Proteinasa K, todos estos del mismo control (pTS1), y como negativo el cn (Celda F1).

Figura 7. Hibridación *dot-blot* de TSV de los organismos de la muestra 00 SIN S 6-1. *Controles positivos:* 1) Producto de RT-PCR del control pTS2 (Celda A1); 2) Producto de RT-PCR (Celda B1); 3) Extracto de ARN (Celda C1); 4) Homogenizado de tejido tratado con Proteinasa K (Celda D1); 5) Homogenizado de tejido directo (Celda E1), estos últimos cuatro, preparados a partir del control pTS1; *Control negativo:* ARN del cn. *Homogenizado de tejido* (Celdas A2 y B2) y *ARN* (Celdas C2 y D2), ambos en 1 y 2 µl del organismo 8. *Productos de RT-PCR* de los 10 organismos de la muestra (Fila 3).

Con los resultados de esta última prueba se confirma que se presentan reacciones de hibridación sólo cuando se utilizan como templete productos de RT-PCR. Estos resultados coinciden con la prueba de RT-PCR anterior, ya que tampoco se detectó TSV en los organismos 3 y 7.

IV.2.2. YHV.

Los resultados que se muestran en la membrana de la prueba inicial de *dot-blot* que se realizó con los organismos de las muestras 00 NAY 4-1 y 00 SIN C 5-1 coinciden parcialmente con los de TSV, pues tampoco fue posible detectar a este virus cuando se utiliza como templete homogenizados de tejido. Sin embargo se observó que los extractos de ARN son suficientes para realizar con éxito la detección de YHV, ya que se empleó como control positivo un extracto de ARN de organismos infectados experimentalmente (Figura 8).

Figura 8. Primera prueba de hibridación *dot-blot* de YHV. *Control positivo:* ARN del control pYH; *control negativo:* ARN del cn (Celda B2); *homogenizados de tejido* de los organismos de las muestras 00 NAY 4-1 (Fila 3) y 00 SIN C 5-1 (Fila 4).

Tomando en cuenta lo anterior, se diseñó una segunda prueba (Figura 9) en la que se fijaron como controles positivos un producto de RT-PCR (Celda A1), un extracto de ARN (Celda B1) y un homogenizado de tejido (Celda C1), todos provenientes del control pYH. Como negativo se uso el cn (Celda D1) y como moldes los homogenizados de tejido de cada uno de los organismos de las muestras 00 NAY 4-1 y 00 SIN C 5-1 (Filas 2 y 4, respectivamente), además de los extractos de ARN de hemolinfa que representa a cada una de estas muestras en las filas 3 y 5, en cantidades de 1, 2 y 4 µl en las columnas A, B y C, respectivamente.

Se encontró que reaccionaron solamente dos de los controles positivos (el producto de RT-PCR y el extracto de ARN), además de los extractos de ARN de la hemolinfa de las dos muestras usadas para esta prueba.

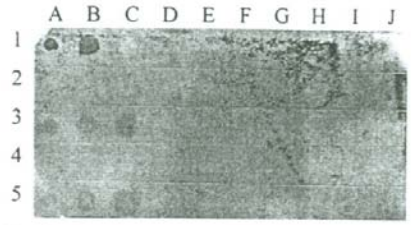

Figura 9. Segunda prueba de hibridación *dot-blot* de YHV. *Controles positivos:* 1) Producto de RT-PCR (celda A1); 2) ARN (celda B1) y 3) Homogenizado de tejido (celda C1), los tres del control pYH; *Control negativo:* ARN del cn (celda D1). *Homogenizados de tejido* de los organismos de las muestras 00 NAY 4-1 y 00 SIN C 5-1 (Filas 2 y 4) y el *ARN* extraído de la hemolinfa que representa a estas muestras en 1, 2 y 4 µl (Filas 3 y 5, respectivamente).

Tomando esto en cuenta, se diseñó una última prueba para detectar cuales organismos de cada muestra estaban infectados. Para esto, se fijó de nueva cuenta el extracto de ARN del control pYH en 1 y 2 µl (Celdas A1 y B1, respectivamente), un homogenizado de tejido

(Celda C1) y el ARN del cn (Celda D1), los moldes consistieron en los extractos de ARN que representan a las muestras 00 NAY 4-1 y 00 SIN C 5-1 en 1 µl solamente (Celdas A2 y A5), en las filas 3 y 4 los extractos de ARN y los homogenizados de tejido de cada uno de los nueve organismos de la muestra 00 NAY 4-1, y por último en las filas 6 y 7 los extractos de ARN y los homogenizados de tejido de los diez organismos de la muestra 00 SIN C 5-1 (Figura 10 y Tabla III). En la cual se puede observar claramente que el 100% de los organismos de ambas muestras presentaron reacciones de hibridación, debido a la presencia del virus.

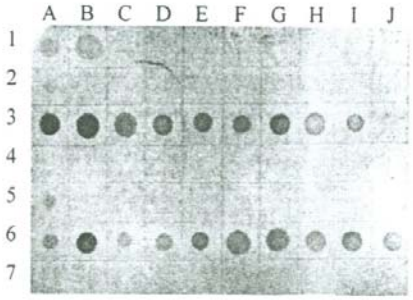

Figura 10. Hibridación *dot-blot* de YHV. *Controles positivos:* 1) ARN en 1 y 2 µl (Celdas A1y B1); 2) Homogenizado de tejido (Celda C1), ambos del control pYH; *Control negativo:* ARN del cn (Celda D1); *ARN* de las muestras 00 NAY 4-1 y 00 SIN C 5-1 en 1 µl (Celdas A2 y A5); *ARN y homogenizados de tejido* de los organismos de las muestras 00 NAY 4-1 (Filas 3 y 4) y 00 SIN S 5-1 (Filas 6 y 7).

Tabla III. Resultados de las pruebas de detección de los virus WSSV, IHHNV, TSV y YHV en 17 muestras de camarón colectadas en el norte e Nayarit y en las zonas sur y centro del estado de Sinaloa . WSSV: los datos se refieren a PCR tradicional y con el DAV (en paréntesis). IHHNV: pruebas DAV. TSV y YHV: pruebas de RT-PCR e hibridación *dot-blot* (en paréntesis). +: presencia detectada; –: presencia no detectada. Se presentan también las prevalencias parciales y globales para cada virus.

Zona geográfica	Muestra	WSSV	IHHNV	TSV	YHV
Norte de Nayarit	00 NAY 4-1	–	+	–	+ (9/9)
	00 NAY 5-1	+ (+)	+	+	–
	00 NAY 6-1	+ (+)	+	–	–
	00 NAY 7-1	–	+	–	–
	00 NAY 7-2	+ (+)	+	–	–
	00 NAY 8-1	– (+)	+	–	–
	00 NAY 9-1	–	+	–	–
	Prevalencia parcial	42.9 % (57.1 %)	100.0 %	14.3 %	14.3 %
Sur de Sinaloa	00 SIN S 3-1	–	–	–	–
	00 SIN S 5-1	– (+)	–	–	–
	00 SIN S 5-2	– (+)	–	+	–
	00 SIN S 6-1	–	+	+ (8/10)	–
	00 SIN S 6-2	–	+	–	–
	00 SIN S 7-1	–	+	–	–
	00 SIN S 8-1	–	–	–	–
	Prevalencia parcial	0.0 % (28.6 %)	42.9 %	28.6 %	0.0 %
Centro de Sinaloa	00 SIN C 3-1	+ (+)	+	–	–
	00 SIN C 4-1	+ (+)	+	+	–
	00 SIN C 5-1	–	+	+	+ (10/10)
	Prevalencia parcial	66.7 % (66.7 %)	100.0 %	66.7 %	33.3 %
Prevalencia global		29.4 % (47.1 %)	76.5 %	29.4 %	11.8 %