



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL SINDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) EN INFECCIONES DE CAMARÓN-JAIBA

MEMORIA DE PRÁCTICAS PROFESIONALES

Que para obtener el Título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta:

Liliana Adilene Moraga Amaya

Hermosillo, Sonora.

Abril, 2016

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

CONTENIDO

	Página
INDICE DE FIGURAS	iii
INDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	1
I. INTRUDUCCIÓN Y OBJETIVOS	2
I.1 Objetivo General.....	3
I.1.1 Objetivos Particulares.....	3
II. ANTECEDENTES	4
II.1 Fundamento Teórico de las Herramientas y Conocimientos Aplicados.....	4
II.1.1 Extracción de ADN.....	5
II.1.2 Cuantificación de ADN.....	6
II.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	7
II.1.4 Electroforesis.....	12
II.1.4.1 Electroforesis en Geles de Agarosa.....	12
II.1.5 Marco de Lectura Abierta (ORF).....	13
II.1.6 Curvas de Disociación de Alta Resolución (HRM).....	14
III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	16
III.1 Procedimientos Empleados Para Determinar la Presencia de WSSV.....	16
III.1.1 Toma de Muestra.....	16
III.1.2 Procedimiento Para Obtención de Inoculo Viral.....	17
III.1.2.1 Preparación del Inóculo.....	18
III.1.3 Procedimiento de Inoculación en Crustáceos Con WSSV.....	19
III.1.3.1 Inoculación Intramuscular.....	21
III.1.4 Extracción de ADN.....	22
III.1.5 Cuantificación de ADN.....	23
III.1.6 Electroforesis.....	24
III.1.7 Amplificación por PCR.....	24
III.2 Actividades Previas.....	25
III.3 Actividades Desarrolladas.....	25

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
IV.1 Datos Obtenidos.....	28
IV.1.1 Cuantificación de ADN.....	28
IV.1.2 Resultado del ORF94.....	29
IV.1.3 Resultados de HRM.....	30
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	34

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Proceso de PCR en los primeros ciclos de reacción, comúnmente se utilizan 35 ciclos para amplificar el fragmento de interés.....	10
Figura 2. Gel de agarosa. Se representan mediante bandas de un tamaño determinado, los productos de la PCR o amplicones y se hace la comparación con un marcador de peso molecular. (PB) número de pares de bases.....	11
Figura 3. Morfología del camarón.....	17
Figura 4. Diagrama de flujo para obtención del inóculo.....	20
Figura 5. Sitios recomendados de inoculaciones en A) jaibas y B) camarones.....	21
Figura 6. Aplicación de electroforesis en gel de agarosa para las reacciones resultantes de PCR punto final mediante el ORF 94.....	29
Figura 7. Curvas de Melt obtenidas de las reacciones con ADN de camarón, jaiba e inóculo, donde se muestra en color violeta el comportamiento de la jaiba.....	30
Figura 8. Diferentes señales emitidas de las muestras de camarón, jaiba e inóculo a un aumento de temperatura constante.....	31
Figura 9. Picos de desnaturalización del camarón, jaiba e inóculo.....	32

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Proporciones necesarias para el tamaño de la muestra de acuerdo a la talla del crustáceo y el tipo de tejido.	18
Tabla II. Datos utilizados para conocer la concentración de ADN que se utilizaría en las reacciones de PCR	28

RESUMEN

Actualmente se han aislado diferentes genotipos de mancha blanca en base a su Ácido Desoxirribonucleico (ADN), pero comparando las diferentes secuencias de la proteína viral (gen vp28) que codifica para la principal proteína estructural del virus que probablemente interviene en la infección, se ha observado que hay algunas diferencias en las secuencias de nucleótidos del gen vp28. Sería de gran aportación al conocimiento del virus del síndrome de la mancha blanca el determinar si el gen sufre alguna mutación al infectar diferentes especies de crustáceos (camarón-jaiba). El Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) tiene como una de sus principales actividades, la investigación y el análisis sobre el comportamiento del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV por sus siglas en inglés) en medios acuícolas para su mejor tratamiento. El WSSV se puede activar mediante la preparación de un inóculo viral utilizando tejido muscular infectado por el virus, por lo que el objetivo de este trabajo fue activar el virus en el camarón y estudiar su comportamiento en otro crustáceo, como en este caso la jaiba, por lo cual se extrajo ADN y se realizaron pruebas de PCR y HRM para un resultado más detallado donde se pudieron encontrar variaciones genéticas del virus en el organismo de la jaiba. Con estos resultados se podrá indagar y profundizar aún más en el comportamiento que el virus pueda tener en las diferentes especies de crustáceos, principalmente los que más habitan en los estanques acuícolas diferentes del camarón, para poder tomar mejores medidas de higiene en esta industria y evitar aún más pérdidas de producto y mejorar su calidad y la economía de las empresas así como también contribuirá la conservación de los recursos naturales.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El CIBNOR es el centro público de investigación que tiene como visión ser la institución de mayor contribución al progreso económico y social del país, mediante la generación de conocimiento científico, el desarrollo tecnológico y la innovación en el campo de las ciencias biológicas y preservación de los recursos naturales.

La acuicultura actualmente toma un papel muy importante en la preservación de recursos naturales y la industria alimentaria, por lo cual también es un área muy estudiada, donde tienen que presentarse medidas de higiene y salud en los campos acuícolas y principalmente en los laboratorios de investigación donde se arrojan los resultados de diversos análisis de muestras provenientes de diferentes campos acuícolas.

Los estudios e investigaciones que se han llevado a cabo en los laboratorios han sido cada vez más intensivos y específicos, ya que el camarón como crustáceo de primera importancia económica y siendo el producto pesquero más solicitado en el mundo, ha presentado como consecuencia la aparición de enfermedades endémicas producidas por hongos, bacterias y virus (Terán-Díaz, 2012).

El WSSV se encuentra colocado entre los virus más letales que infectan camarones, es un patógeno extremadamente virulento y se replica rápidamente, ha surgido mundialmente como uno de los más frecuentes. Fue detectado por primera vez en Taiwán en 1992, y luego se extendió a Japón y casi todos los países asiáticos. El primer caso de WSSV en América ocurrió en 1995 en una granja de camarón de sur de Texas, y se sugirió que la ruta más probable para su introducción fue a través de un importado congelado de camarón asiático. Algunos de los signos de WSSV son el letargo, la reducción repentina en el consumo de alimentos, la decoloración roja del cuerpo y apéndices y una cutícula suelta (Sánchez-Paz, 2010).

I.1 Objetivo General

Determinar si el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) presenta algún cambio o genotipificación al transmitirse de una especie de crustáceo a otra.

I.1.1 Objetivos Particulares

- Obtener un inóculo viable para transmitir la infección de camarón a jaiba.
- Determinar si hay diferentes genotipos WSSV utilizando el Marco de Lectura Abierta 94 (ORF94 por sus siglas en inglés).
- Realizar genotipificación del virus en base al gen VP28 utilizando la técnica de Curva de Alta Resolución (HRM por sus siglas en inglés).

II. ANTECEDENTES

II.1 Fundamento Teórico de las Herramientas y Conocimientos Aplicados.

Se conoce que el cultivo de camarón en México se lleva a cabo en ambientes cerrados y abiertos. El cerrado se realiza en los laboratorios de producción de larvas, en donde el abastecimiento de agua, alimento y organismos reproductores de las instalaciones se emplean estrictos controles sanitarios. Por otro lado, una vez que las postlarvas son introducidas a los estanques de engorda, son sometidas a un ambiente abierto en donde el ambiente es compartido por diversos organismos entre ellos los crustáceos como los camarones, jaibas y cangrejos (Terán-Díaz, 2012).

Una vez estando el virus del síndrome de la mancha blanca en el medio compartido por las diferentes especies, utiliza la transmisión horizontal como ruta de propagación entre las especies de crustáceos.

La genotipificación del WSSV se basa en el número variables de repetición en tándem (VNTR), análisis dentro de marco de lectura abierto (Tang et al., 2012), en este caso el ORF 94.

Se han realizado investigaciones en otros países en donde las pérdidas de producción de camarón aumento cuando el WSSV apareció en sus granjas. Para determinar este brote viral mediante pruebas en ORFs y PCR (Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés), seguido de análisis de secuencias de ADN. Se han desarrollado métodos de genotipificación para caracterizar y diferenciar cepas virales recopiladas a partir de poblaciones infectadas entre aislamientos geográficos. Encontrando así nuevas variantes del genotipo del WSSV para entender mejor el origen y la propagación de este virus (Tang et al., 2012).

Los camarones también puede estar infectado crónicamente sin signos de la enfermedad y con frecuencia obtener la infección en los criaderos de reproducción infectados donde también existe una amplia gama de otros crustáceos que pueden actuar como portadores aparentemente sanos de infección. Existen resultados de investigaciones anteriores donde los crustáceos salvajes de el mismo estanque compartían un mismo genotipo, parecían estar afectados en un nivel bajo, mientras que el brote de la enfermedad y la mortalidad se presentó en el camarón de cultivo. En general se sugiere que los crustáceos silvestres no son una fuente común de infección de WSSV en el camarón de cultivo, pero sin duda el análisis del genotipo puede ser una muy útil herramienta en el estudio de la dinámica de infección por WSSV en el medio ambiente del estanque y para mejorar el desarrollo de estrategias más rentables para el manejo de esta enfermedad (Hoa et al., 2005).

II.1.1 Extracción de ADN

Para obtener una buena muestra implica un correcto proceso para la obtención de ADN a partir de materia biológica.

Para la extracción de ADN se necesita llevar a cabo una etapa de lisis, en la cual se rompen las estructuras que aíslan el citoplasma y libera su contenido, y la siguiente de purificación, que consiste en separar la solución final de los elementos que pudieran perjudicar al momento de realizar la prueba de PCR.

- Pasos para una correcta extracción y purificación del ADN:
 1. Lisis celular. Con ayuda de sales caotrópicas se rompe la estructura tridimensional de las proteínas y los ácidos nucleicos para su desnaturalización. En este caso se realizó utilizando Buffer GT (Tiocianato de guanidinio) que es un compuesto químico utilizado como degradante

de proteínas en general y es comúnmente utilizado en la extracción de ADN y ARN.

2. Degradación de la fracción proteica. Se logra mediante la adición de una proteasa que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas asociadas al ADN. Las proteínas, lípidos y restos celulares pueden precipitarse mejor con la ayuda de la sílica, como en este caso.
3. Purificación. Se divide en tres etapas.
 - El ADN se precipita en etanol o isopropanol ya que es insoluble en alcohol y se recupera mediante una centrifugación. Se retira el sobrenadante que contiene la sílica añadida previamente.
 - Lavado de pellet. Se agrega alcohol y vuelve a centrifugarse.
 - Recuperación. El sedimento se resuspende en agua tras ser secado completamente, y se extrae del sobrenadante (<http://www.microbial-systems.com>. 2009, Enero-Febrero).

II.1.2 Cuantificación de ADN

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de ADN. La absorción de UV de ADN es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración. Cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y por lo tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de ADN (Scientific, T.F. 2009)

Las concentraciones base de proteína en absorbancia son típicamente determinadas usando la longitud de onda de 280 nm correspondiente a triptófano, tirosina, y en menor medida los residuos de cisteína presentes en la secuencia primaria de proteínas. Por el contrario, la proteína o secuencias de péptidos ausentes de estos residuos pueden ser cuantificadas, en los sistemas de amortiguación no absorbentes. Este método monitoriza la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm. El espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000c utiliza la longitud de onda UV de 205 nm en conjunción con el sistema patentado y la tecnología de retención de la muestra para permitir microorganismos sensibles a volumen y mediciones de cuantificación de péptidos y proteínas.

II.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary Mullis que permite la síntesis de secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN). Se basa en la réplica del ADN en los organismos eucariotas, el ADN es un polímero formado por dos cadenas complementarias, constituido por unidades de desoxirribonucleótidos de cuatro bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina y timina unidas al azúcar desoxirribosa (Torres, Baca 1995). La réplica de ADN es utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy altas, es proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a muy elevadas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial *taq* polimerasa. Es la enzima encargada de la síntesis de una cadena complementaria de ADN usando un molde de cadena sencilla a partir de una región de doble cadena. Una reacción de PCR es la mezcla de todos los ingredientes necesarios para simular lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN: la polimerasa, el ADN del organismo a estudiar (donde se encuentra el fragmento que se quiere sintetizar), los oligonucleótidos (llamados *primers*, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.)

necesarios para la transcripción, dinucleotidos (dNTPs), y algunas condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (pH, cantidades de MgCl, KCl, dependiendo de cada polimerasa) (Espinosa, 2007).

El proceso de PCR consiste en llevar a cabo ciclos alternados de temperaturas altas y bajas, que permiten separar las hebras de ADN formadas entre sí en cada fase de réplica y de nuevo la unión de estas hebras mediante la polimerasa para volverse a duplicar.

Las tres etapas principales del ciclo de la PCR son las siguientes:

- **Desnaturalización.** Consiste en el calentamiento y separación de las cadenas de ADN a una temperatura alrededor de los 95°C durante 20-30 segundos, esto depende de la cantidad de G-C ya que se necesita más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, a diferencia de A-T que está formado por uno menos. También depende del modelo del equipo ya que en base a esto, la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura varía. Las cadenas separadas son el producto final de esta etapa.
- **Hibridación o alineamiento.** En este paso, los primers se alinean al extremo 3' del templado separado en la etapa anterior e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es necesario que la temperatura de hibridación o melting (T_m) se encuentre entre los 50-60 °C generalmente. Con un diseño correcto de primers y temperatura adecuada la estabilidad del complejo será eficiente (Tamay de Dios et al., 2013).
- **Extensión.** Finalmente, se incrementa a la temperatura óptima de 72 °C a la cual la ADN polimerasa alcanza su máxima actividad, y continua la síntesis de los fragmentos de ADN que ya se habían alineado.

Con estos tres cambios de temperatura, en el primer ciclo se sintetizaran los primeros fragmentos a partir del ADN genómico. Los primeros fragmentos

obtenidos serán un poco más grandes de lo esperado, ya que la *taq* copiará hasta donde le sea posible, pero al final del proceso se obtendrán cantidades tan pequeñas que al final no podrán detectarse. Después se repiten las tres temperaturas pero en este ciclo los *primers* además de unirse al ADN inicial, también se unen a los fragmentos sintetizados del primer ciclo (Figura 1), por lo cual la polimerasa copiará dos fragmentos largos del ADN y dos del tamaño esperado. Así es como con cada ciclo aumenta la cantidad de fragmentos del tamaño deseado (Espinosa, 2007).

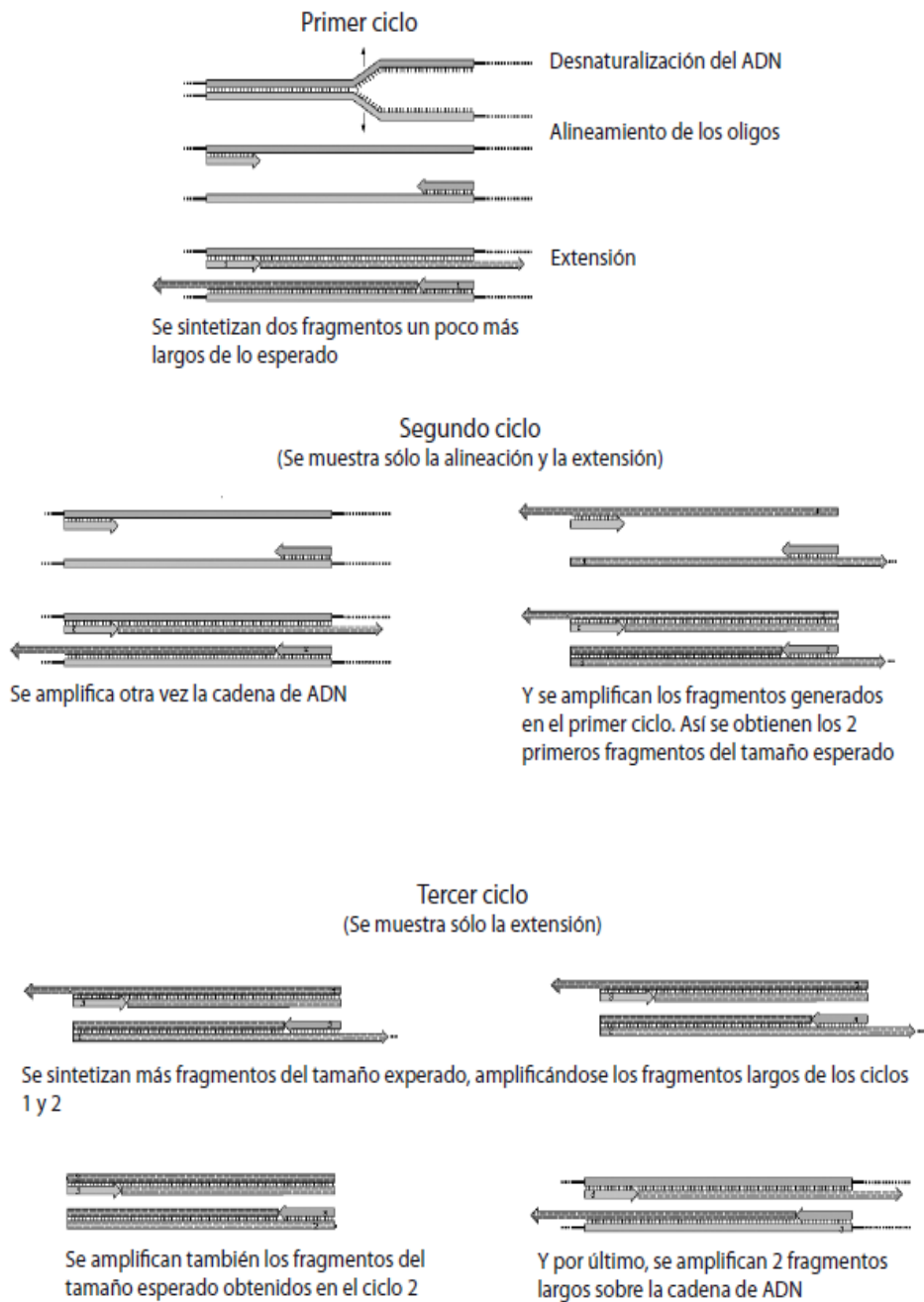
II.1.3.1 Tipos de Técnicas PCR Utilizadas

- **PCR de punto final.**

Amplifica la región de interés en el ADN molde, mediante secuencias sintéticas específicas.

Esta variación también conocida como PCR convencional permite visualizar al finalizar una reacción en el termociclador, la acumulación de amplicones generados en un número establecido de ciclos por medio de una electroforesis (Figura 2).

Los amplicones son manipulados mediante una electroforesis para el análisis de resultados, para esto se debe de contar con el equipo necesario: cámara de electroforesis, fuentes de poder y los materiales requeridos para su funcionamiento (Fernández J., Olivares B., Soledad 2013).



Fuente: Parkes H. 2003. Food for Thought http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes_may99.htm, accesado 08/03.

Figura 1. Proceso de PCR en los primeros ciclos de reacción, comúnmente se utilizan 35 ciclos para amplificar el fragmento de interés.

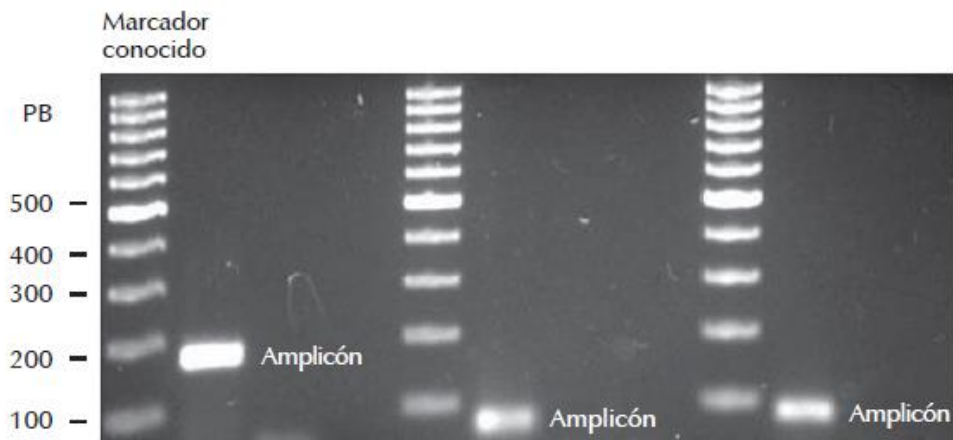


Figura 2. Gel de agarosa. Se representan mediante bandas de un tamaño determinado, los productos de la PCR o amplicones y se hace la comparación con un marcador de peso molecular. (PB) número de pares de bases.

- **PCR de Tiempo Real.**

Su objetivo principal es detectar y cuantificar las secuencias de ácidos nucleicos mediante el uso de agentes fluorescentes en la reacción.

El principio de esta variante está basada en la PCR de punto final, a diferencia de la detección y análisis de los productos de amplificación que se lleva a cabo en esta técnica es diferente. Las grandes ventajas de la PCR en tiempo real, es que no hay necesidad de que el producto de amplificación sea manipulado en un gel de agarosa para tener certeza de que fue una reacción exitosa como en la PCR punto final, ya que es monitoreado conforme transcurre la reacción.

Este sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad, y eficiencia para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Frecuentemente es aplicada para la cuantificación de pequeños cambios en expresiones genéticas mediante la

detección de los niveles de ARNm procedente de células o tejidos (Tamay de Dios et al., 2013).

II.1.4 Electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos – y +), dependiendo de la combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

En una escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y se utiliza como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Es útil también para conocer otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (Morales y Gallo, 2006).

II.1.4.1 Electroforesis en Geles de Agarosa.

La agarosa es un polisacárido que originalmente se obtiene de algas, como el agar-agar, cuyas disoluciones poseen la propiedad de mantenerse en estado líquido por encima de los 50 °C y formar un gel semisólido al enfriarse (Morales y Gallo, 2006).

La electroforesis en gel de agarosa es la más utilizada para analizar y caracterizar ácidos nucleicos. Los geles se comportan como un tamiz molecular que permite separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Las moléculas de ADN de diferente tamaño emigran de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. Con la aplicación de marcadores de peso molecular se puede calcular el tamaño aproximado del ADN en dicha electroforesis.

- Utilizando el Sistema de electroforesis E-Gel®:

El sistema de electroforesis en gel de agarosa E-Gel®, es un sistema de bufferless completo para la electroforesis en gel de agarosa para muestras de ADN.

Los componentes principales del sistema son:

- ✓ Geles de agarosa prefabricados E-Gel®
- ✓ Bases de electroforesis

Los geles de agarosa prefabricados E-Gel®, son geles autónomas que incluyen electrodos empaquetados dentro de una casete-UV transparente seca, desechable. El gel de agarosa E-Gel®, se ejecuta en un dispositivo especialmente diseñado, que es una base y fuente de alimentación combinado en un solo dispositivo (E-Gel® Technical Guide).

II.1.5 Marco de Lectura Abierta (ORF)

Los marcos de lectura se encuentran en el ADN y ácido ribonucleico (ARN), son una secuencia de información genética que contiene los datos que se utilizan para codificar aminoácidos.

El marco de lectura es la sección de ADN o ARN que contiene instrucciones para hacer una proteína completa. En el ADN, hay seis marcos de lectura posibles, ya que el inicio de un marco de lectura depende de donde uno empieza a leer, y el ADN es de doble cadena. Con el ARN, existen tres posibles marcos de lectura. Una sección de lectura comienza con un codón de inicio (AUG) y uno de parada (UAA, UAG o UGA). Un marco abierto de lectura puede contener un gen completo, o los genes que se solapan; el código genético no siempre es tan ordenado como uno podría imaginar.

Complementariamente el ORF es una porción de una molécula de ADN que cuando se traduce a los aminoácidos, no contiene codones de terminación. El código genético lee secuencias de ADN en grupos de tres pares de bases, esto significa que, en una molécula de ADN de doble hebra, hay 6 posibles sentidos en los que pueden abrirse marcos de lectura, tres en dirección hacia adelante y tres en reverso. Un marco abierto de lectura larga es probable que sea parte de un gen (Medina Walteros et al., 2012).

- **Marco de Lectura Abierta ORF 94**

La genotipificación del WSSV se basa en el Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTR por sus siglas en inglés) dentro de un marco abierto de lectura, como en este caso el ORF 94 constituido por unidades de repetición (UR) de 54 pares de bases. Se ha analizado en varios estudios epidemiológicos y análisis filogenéticos en los últimos años, por ejemplo en México (Galaviz et al., 2009) y Arabia Saudita (Tang et al., 2012) con el objeto de conocer la variabilidad de las cepas de WSSV y el posible origen. La amplia variabilidad de las UR del ORF 94 conduce a la pregunta si éste produce una proteína funcional, y si se encuentra asociada a la virulencia de las cepas, lo cual podría analizarse en futuros trabajos (Galaviz et al., 2009).

II.1.6 Curvas de Disociación de Alta Resolución (HRM)

Este método se basa en las características de desnaturalización térmica de los amplicones y suministra información con un rendimiento nunca antes alcanzado por el análisis de la curva de disociación clásica de ADN. Las variaciones en las secuencias son detectadas tanto por un cambio en la T_m como por un cambio en la forma de la curva de disociación. Esto es posible gracias a la introducción de fluorocromos de unión a doble cadena de ADN de tercera generación y a la incorporación de instrumentos de PCR a tiempo real con un sistema de control de temperatura preciso y una capacidad de captura de datos avanzada. Los datos

son analizados y manipulados con programas diseñados específicamente para el análisis de HRM.

Los aspectos más importantes a considerar en un análisis de HRM son:

- Química. El análisis de HRM utiliza fluorocromos de tercera generación, Son fluorocromos que presentan una baja toxicidad en las reacciones de amplificación y por tanto pueden ser usados a mayores concentraciones que los convencionales para conseguir una mayor saturación de las muestras de ADN de doble cadena. No interfieren con la reacción de la PCR.
- Instrumentos. El análisis de HRM requiere instrumentos que recolecten datos de fluorescencia a una resolución de temperatura muy fina.
- Software. El análisis de HRM requiere un programa más sofisticado que use nuevos algoritmos.

HRM es una técnica simple, fácilmente accesible y de bajo coste que sirve para analizar de forma rápida múltiples variantes genéticas. No obstante, el cuidado en la preparación de la muestra y el planteamiento del diseño experimental, en especial el diseño de cebadores, son cruciales para la obtención de resultados robustos y reproducibles (Gallego y Arjona, 2012).

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

III.1 Procedimientos Empleados Para Determinar la Presencia de WSSV

Los siguientes métodos fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del Curso de Sanidad e Inocuidad Acuícola y Pesquera del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal en Jiutepec, Morelos en el año 2011, con el objetivo de detectar la presencia del WSSV mediante PCR.

III.1.1 Toma de Muestra

Para realizar esta actividad es requisito indispensable el uso de guantes, pinzas y tijeras estériles. Para la extracción de cualquier tejido se recomienda usar como soporte un plato desechable, el cual deberá ser cambiado para cada muestra, Asimismo, las pinzas y tijeras deberán sumergirse en cloro (2%) y agua después de la extracción de tejido de cada muestra.

- **Hemolinfa.**

Es el líquido circulatorio de los artrópodos, moluscos, etc. Análogo a la sangre de los vertebrados. Para tomar muestra de hemolinfa se emplea una jeringa de 1mL conteniendo 200 μ L solución anticoagulante, extraer aproximadamente 100 μ L de hemolinfa de la zona ventral del camarón entre el último par de pereiópodos y el primer par de pleópodos (Figura 3). Es importante mantener en todo momento la proporción 2:1 entre la solución anticoagulante y la hemolinfa.

- **Branquias.**

Son los órganos respiratorios de los animales acuáticos, mediante los que se realiza el intercambio de gases, oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂), entre el medio interno y el ambiente. En este caso se realiza la toma de muestra

levantando el cefalotórax en su parte inferior, descubriendo las branquias para así extraer las piezas necesarias.

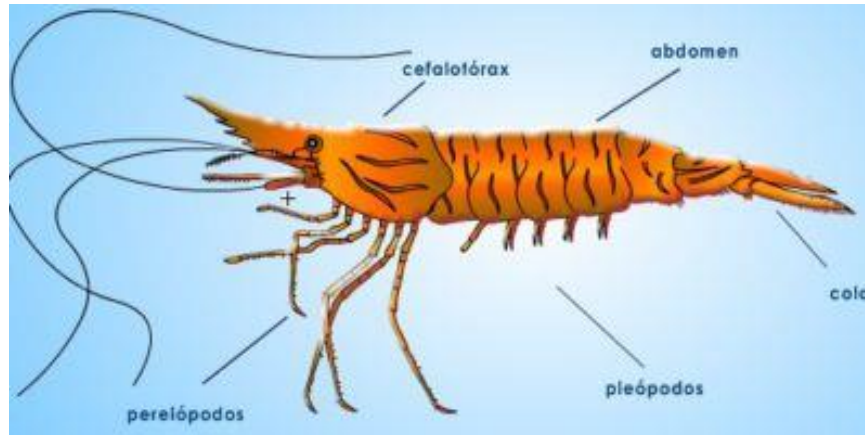


Figura 3. Morfología del camarón.

- **Pleópodos.**

Son los apéndices natatorios de los crustáceos. Para este procedimiento se extraen las piezas necesarias de acuerdo a la Tabla I.

III.1.2 Procedimiento Para Obtención de Inoculo Viral

El objetivo de esta actividad es la preparación del inoculo infeccioso de carga viral conocida a partir de tejido infectado por WSSV. El Inoculo es una suspensión de virus capaz de infectar a organismos sanos. Al obtener un inoculo con carga viral conocida, permitirá incrementar el conocimiento del proceso infeccioso del virus en todas sus etapas.

Tabla I. Proporciones necesarias para el tamaño de la muestra de acuerdo a la talla del crustáceo y el tipo de tejido.

Talla	Tipo de tejido	Tamaño de muestra
> 30g	Branquias	Media pieza
	Pleópodos	Media pieza
10 g – 30 g	Branquias	Una pieza
	Pleópodos	Una pieza
1g – 10g	Branquias	3 piezas
	Pleópodos	3 piezas
100 mg – 1g	Cabeza	~ ½ - 1 cabeza
PL 1 a PL 12	Organismo completo	~ 10 – 20 piezas
< PL	Organismo completo	~ 50 µl

III.1.2.1 Preparación del Inóculo

En este procedimiento se obtiene de tejido infectado con el patógeno de interés previamente diagnosticado por medio de PCR o por Histología. El área muscular es separada del resto del organismo (desechando cefalotórax y exoesqueleto). Se obtiene el peso del músculo y se mezcla con solución salina al 2 % en una relación 1:6 w/v, se homogeniza con un triturador de alimentos o licuadora en 10

pulsos de 10 segundos con pausas de 30 segundos entre cada una de ellas en las que el recipiente se pone en contacto con hielo, El tejido homogeneizado se transfiere a microtubos de 1.7 mL y se centrifuga a 3000 x g durante 20 minutos a 4° C. Posteriormente, el sobrenadante se transfiriere a microtubos de 1.7 mL y el clarificado se centrifuga a 13,000 x g por 20 minutos a 4° C. El sobrenadante se recupera con una jeringa de 10 mL y se filtra utilizando un dispositivo con filtro de membrana de 0.2 µm acoplado a la misma jeringa. El inóculo obtenido se colecta y puede ser utilizado inmediatamente o se almacena a -80 °C hasta su uso (Figura 4), para almacenar por tiempo indeterminado a 80 °C, se agrega GLICEROL a 35%. Finalmente, se toma una alícuota y se cuantifica la carga viral del ADN mediante un análisis de PCR (Curva estándar) en tiempo real (qPCR) (Escobedo-Bonilla et al., 2005).

III.1.3 Procedimiento de Inoculación en Crustáceos Con WSSV

En este procedimiento se busca infectar experimentalmente organismos sanos con un patógeno (WSSV). Existen tres formas de inoculación utilizadas experimentalmente:

- **Vía intramuscular:** Es la forma de administración en la que la sustancia o patógeno se inyecta dentro del músculo.

- **Alimentación forzada:** Es cuando se le administra una sustancia o patógeno en la cavidad bucal de un organismo.

- **Inmersión:** Se le llama a la incorporación de una sustancia o patógeno en un líquido (agua marina etc.)

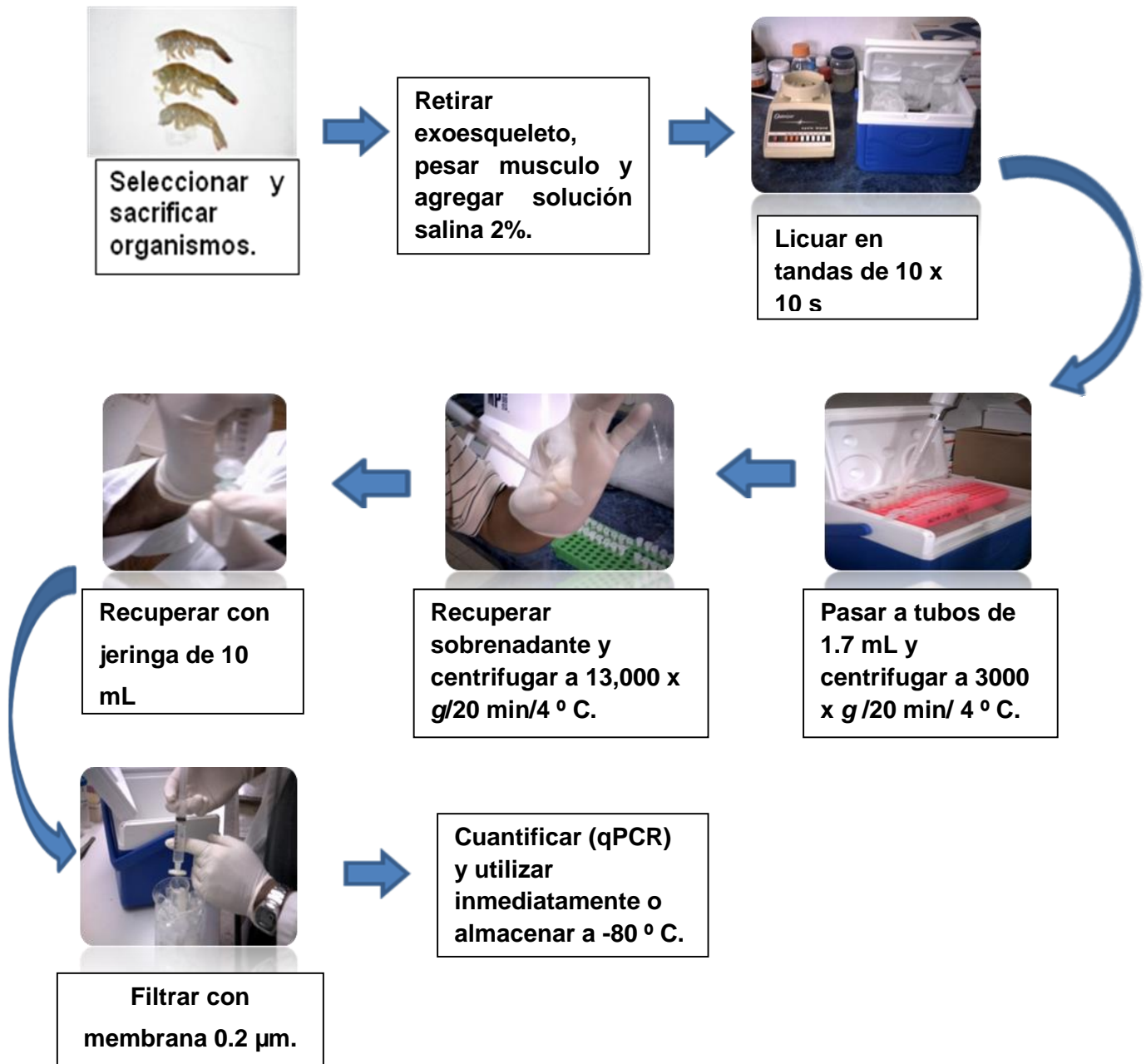


Figura 4. Diagrama de flujo para obtención del inoculo

III.1.3.1 Inoculación Intramuscular

Por fines prácticos y favorables para este proyecto, solo se llevó a cabo la inoculación de ADN por vía intramuscular, donde los organismos son infectados por medio de una inyección intramuscular. Para el caso de jaibas se realizó en la unión de las extremidades con el caparazón. En camarones los últimos tres segmentos abdominales son recomendables para inocular, se debe tener cuidado de **NO** lesionar el intestino, puede observarse en la Figura 5 los sitios recomendados. La cantidad de inoculo administrado dependerá de la talla del organismo y de la concentración del inoculo.

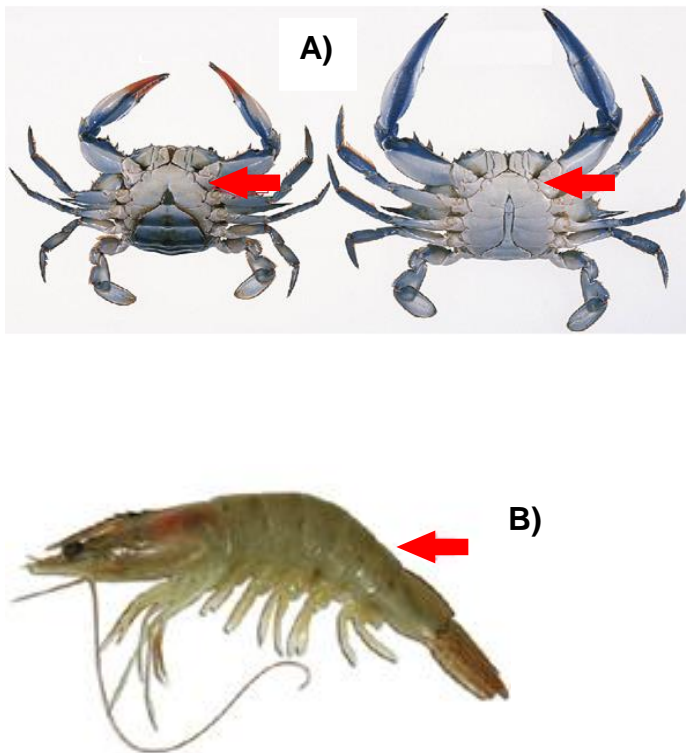


Figura 5. Sitios recomendados de inoculaciones en A) jaibas y B) camarones.

III.1.4 Extracción de ADN

- **Tejido**

La extracción de ADN a partir de tejido, se realizó utilizando el equipo KIT IQ REAL™ de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El tejido se colocó en un tubo de tipo eppendorf (1.7 mL), al cual se le adicionaron 900 µL de GT Buffer y se homogenizó con ayuda de un pistilo, para después centrifugar la muestra a 12,000 g durante 3 minutos. Después se recuperaron 600 µl de sobrenadante que también se colocó en un tubo eppendorf de 1.7 mL, se le adicionaron 40 µL de sílica y se agito en el vortex. De nuevo la muestra es centrifugada a 12,000 g pero esta vez durante 15 segundos y después de ser desechado el sobrenadante se le adiciono 500 µL de GT Buffer y una vez más ser agitada en el vortex. Se repite en ciclo de centrifugado a 12,000 g por 15 segundos y de nuevo el sobrenadante es desechado, se le adiciono 1mL de etanol al 70% y se agitó en el vortex. La muestra es centrifugada una vez más a 12,000 g durante 15 segundos y después de desechar el sobrenadante se le adiciono 1ml de agua DEPC y se agito en vortex de nuevo. En el siguiente paso la muestra fue incubada a 55 °C durante 10 min, al terminar la incubación, se agitó en el vortex y por último se centrifugo por 2 min a 12,000 g, se recuperó el sobrenadante para ser colocado en un tubo tipo eppendorf de 1.7 mL.

Nota: Un procedimiento alternativo, si se cuenta con el equipo, es colocar el tejido en un tubo con perlas de vidrio e introducirlo en un homogeneizador automatizado durante dos periodos de 20 segundos. Continuar con el procedimiento a partir del paso 2.

- **Hemolinfa**

Para obtener el ADN a partir de una muestra de hemolinfa se realizó la extracción y se utilizó el equipo KIT IQ REAL™ de acuerdo a las instrucciones del fabricante, que consistieron en centrifugar la muestra a 6,000 g durante 10 min, para

después desechar el sobrenadante, adicionarle 900 μ L de GT buffer y ser agitada en el vortex. Después se vuelve a centrifugar la muestra a 12,000 g por 3 minutos, recuperando 600 μ L de sobrenadante se colocó en tubos eppendorf de 1.7 mL y se adicionaron 40 μ L de sílica (solución con gránulos microscópicos de sílica), para luego ser agitado en el vortex. Se realiza otro centrifugado a la muestra a 12,000 g durante 15 segundos, se desechó el sobrenadante para adicionar 500 μ L de GT buffer y se agitó en el vortex. Se repite una vez más el centrifugado a 12,000 g por 15 segundos para desechar el sobrenadante, se le adiciono 1 mL de etanol al 70% y se agito de nuevo en el vortex. Se aplicó otro ciclo de centrifugado de 15 segundos a 12,000 g, se desechó el sobrenadante y se adiciono 1 ml de agua DEPC para después agitarse en el vortex. El siguiente paso fue la incubación de la muestra a 55 °C durante 10 min, después se agitó en el vortex y se centrifugo por último a 12,000 g durante 2 min, recuperando 500 μ L de sobrenadante.

Nota: Cuando se recibe la muestra de hemolinfa fijada en alcohol y sin centrifugar, primeramente tiene que ser centrifugada a 12000 g por 3 min, para después eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet por 10 min. Una vez realizados estos pasos se continua en el paso 2 del protocolo.

III.1.5 Cuantificación de ADN

Para conocer la concentración de ADN a utilizar en las reacciones para la amplificación por PCR, se realizó la cuantificación de ADN de acuerdo al protocolo NanoDrop 2000/2000c. Utilizando el software 2000/2000c NanoDrop™ se realizó la siguiente serie de pasos en dicho programa, se selecciona el botón de Editor de métodos en el menú principal, después se selecciona “Nucleic Acid” y se abre un archivo nuevo. Se limpia el lente del equipo y después se coloca 1 μ l de agua, se cierra el lente y en el programa se selecciona “Blank” para que el equipo Nanodrop sepa que se trata de agua y así pueda leer y arrojar una

gráfica lineal. Lo siguiente fue limpiar el agua del lente para poder proceder a leer las muestras de extracción correspondientes, colocando 1 μL de la muestra en el lente y el programa seleccionar “measure” y así podrá arrojar la gráfica correspondiente a la muestra y la correlación ADN en $\text{ng}/\mu\text{L}$.

III.1.6 Electroforesis

El método de electroforesis se realizó utilizando el equipo de E-Gel®, en gel de agarosa prefabricado. La corrida en el gel se hizo siguiendo los pasos que propone el fabricante, si el gel no incluye el marcador se procede a prepararlo. El análisis consistió en introducir 10 μL de las muestras correspondientes en los pozos del gel prefabricado con ayuda de una pipeta, colocando también un marcador en uno de los pozos (en los espacios que no se utilizaran, colocar 10 μL de agua), después se colocó el gel de agarosa en la fuente de poder y se corrió por 30 minutos.

III.1.7 Amplificación por PCR

Para la amplificación por PCR se utilizó el equipo Techne y se hizo uso del iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). La amplificación fue realizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante, las cuales, consistieron en un volumen final de 15 μL de la mezcla de reacción, la cual contenía 0.5 μL de cada *primer*, 4.5 μL de agua libre de nucleasas, 7.5 μL iQ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) (se calcula para cada una de las reacciones tomando en cuenta la muestra de control negativo), por último 2 μL de ADN, como templado. Para las amplificaciones por PCR se siguió el protocolo para el ORF 94 que consistió en un ciclo de 5 minutos a 95 °C, después en 35 ciclos de 35 segundos a 95 °C, 35 segundos a 60 °C, 35 segundos a 72 °C y por último un ciclo de elongación de 3 minutos a 72 °C. Al final del qPCR se realizó una curva de disociación para verificar la especificidad

de los productos obtenidos, en algunos casos también se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 4 y 2.1 % en E-Gel® (Invitrogen™) teñidos con bromuro de etidio para confirmar el tamaño del producto.

III.2 Actividades Previas.

Las especies que se utilizaron para el estudio fue el Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*) proveniente del Golfo de California y la Jaiba Azul (*Callinectes arcuatus*) que fue recolectada del estero “Las jaibas” de Bahía de Kino. Durante el desarrollo de este proceso se les mantuvo alimentadas tanto a las jaibas como a los camarones y con los cuidados necesarios como el cambio constante de agua y oxigenación a los medios acuarios y se sometieron a una temperatura adecuada y constante para su organismo durante el tiempo que se requirió.

Se procedió a tomar muestra de hemolinfa mencionada anteriormente para cada uno de los organismos vivos, ya que es necesario cerciorarse de que estos no estuvieran ya contaminados por el WSSV, ya que también suele encontrarse en medios silvestres.

III.3 Actividades Desarrolladas

Después de haberse realizado las pruebas correspondientes para descartar que los organismos ya vinieran contaminados de su medio ambiente natural, se extrajo y se cuantifico ADN de cada una de las muestras, se prepararon las reacciones correspondientes para las pruebas de PCR y electroforesis.

Una vez demostrado que los organismos estaban libres del virus WSSV, se prosiguió a preparar el inóculo obtenido a partir de tejido de camarón (tres

camarones) infectados con WSSV y siguiendo los pasos del protocolo ya establecido de maceración de tejido y filtración.

Fueron inoculados tres de los camarones, a los cuales se les mantuvo con los mismos cuidados necesarios pero a una temperatura de 29 °C que favoreció la replicación del virus y se realizaron muestreos de hemolinfa para mayor seguridad de que el virus se estuvo replicando para tomar la fuerza suficiente hasta lograr que el camarón muriera o en su defecto el inoculo no tendría el rendimiento necesario para infectar al organismo del camarón.

Las siguientes extracciones para la obtención de ADN se realizaron a partir de muestras de camarón tomadas a diferentes horas pero a la misma temperatura de 29 °C, se realizaron las pruebas correspondientes asegurándome de que el virus se replicara en el organismo del camarón, lo cual provocó su muerte a los tres días de su inoculación.

El análisis y estudio del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca en el organismo de la jaiba consistió en separar dos acuarios, uno para las jaibas de control negativo y otro para las de control positivo, es decir, las jaibas que fueron inoculadas. El día 15 de julio se tomaron siete jaibas medianas como control, a las cuales se las inyectó 100µL c/u de SSF (solución salina), a las 12:40 p.m. a 29°C y se inocularon cinco jaibas con 100µl c/u de WSSV a las 12:50 pm a 29°C.

La toma de hemolinfa de las jaibas se hizo a las 24, 48, 72 y 96 horas después de su hora de inoculación. El día 17 de julio murió la primera jaiba, el 19 de julio muere la segunda y el día 22 de julio mueren las jaibas restantes de control positivo.

Se tomó tejido (branquias) de cada uno de los organismos muertos y del inóculo utilizado y junto con las muestras de hemolinfa a las diferentes horas, se procedió a extraer y cuantificar el ADN de cada una. Para someter el ADN a PCR tiempo final con el ORF94, se prepararon las muestras con sus respectivas reacciones y los primers adecuados. Para poder observar si el ADN presentaba algún cambio significativo en el gen vp28, también se hizo uso de prueba de electroforesis, ya que esta proteína es la utilizada por el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca para infectar las células.

Ya que no se encontró un cambio significativo en el gen de la vp28 del virus, la última prueba que se realizó fue de HRM, esto para tener mayor certeza de los resultados obtenidos con ORF94. Como se explicó anteriormente, la prueba de HRM es mucho más detallada sobre cada nucleótido de la cadena del ADN del virus y gracias a esto, se pudieron encontrar diferentes genotipos del virus WSSV mostrados en las imágenes del siguiente apartado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Datos Obtenidos

IV.1.1 Cuantificación de ADN

En la Tabla II se puede observar la concentración en ng/ μ L y la pureza para cada una de las muestras expresada en la relación $A_{260/280}$. En el espectrofotómetro, los ácidos nucleicos absorben con pico en 260 nm y las proteínas con pico en 280 nm, la relación A_{260}/A_{280} de 1,8 o más indica pureza, menos de 1,6 indica presencia de proteínas contaminantes. La concentración de ADN se obtuvo de la relación A_{260}/A_{280} y para cada muestra se cuantificó por triplicado (Müller y Schweizer, 1996).

Tabla II. Datos utilizados para conocer la concentración de ADN que se utilizaría en las reacciones de PCR.

Muestra	ng/ μ L	$A_{260/280}$
In1	13.6	5.28
In2	20.6	3.02
Camin1	22.3	2.45
Camin2	14.4	2.48
Camin3	11.4	3.50
Tj/17	12.7	4.10
Tj/19	8.3	7.13
Tj1/22	12.9	3.09
Tj3/22	22.3	2.54
Tj4/22	14.1	3.56

Las muestras se cuantificaron y posteriormente se ajustaron a 8.3 ng/μL para realizar el PCR, de esta manera se aseguró que todas las muestras tuvieran la misma cantidad de ADN por microlitro al inicio de la PCR. Al cargar un volumen de 2 μL de ADN, se cargó una cantidad de 16.6 ng (8.3 ng/μL x 2 μL), por reacción en un volumen final de 15 μL, para obtener una concentración de 1.10 ng/μL por cada una de las muestras.

IV.1.2 Resultado del ORF94

En la Figura 6 se muestran los amplicones en el gel de agarosa resultados de una prueba de electroforesis, visualizados por medio de UV y siguiendo el protocolo para el ORF 94, que es la prueba más utilizada cuando se buscan diferentes variedades genéticas del virus WSSV. De acuerdo al resultado en jaiba y camarón la imagen muestra que no hay diferencias de acuerdo a ORF 94.

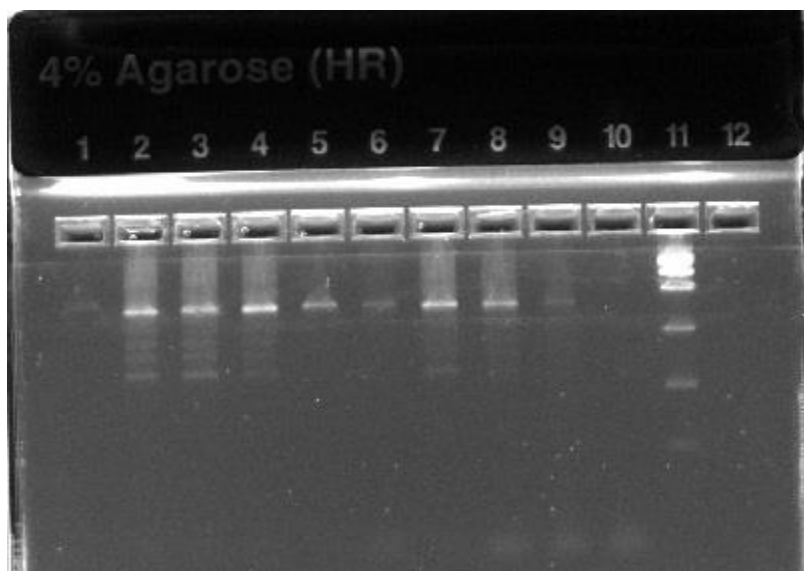


Figura 6. Aplicación de electroforesis en gel de agarosa para las reacciones resultantes de PCR punto final mediante el ORF 94.

IV.3.3 Resultados de HRM

Los resultados del *Melting Curves* se muestran en la Figura 7 y se puede observar como al aumentar la temperatura la curva va en decadencia, esto se debe a que el flourocromo emite una señal al estar adherido a la doble cadena del ADN y al desnaturalizarse este se separa de la cadena y deja de emitir su señal (Gallego y Arjona, 2012).

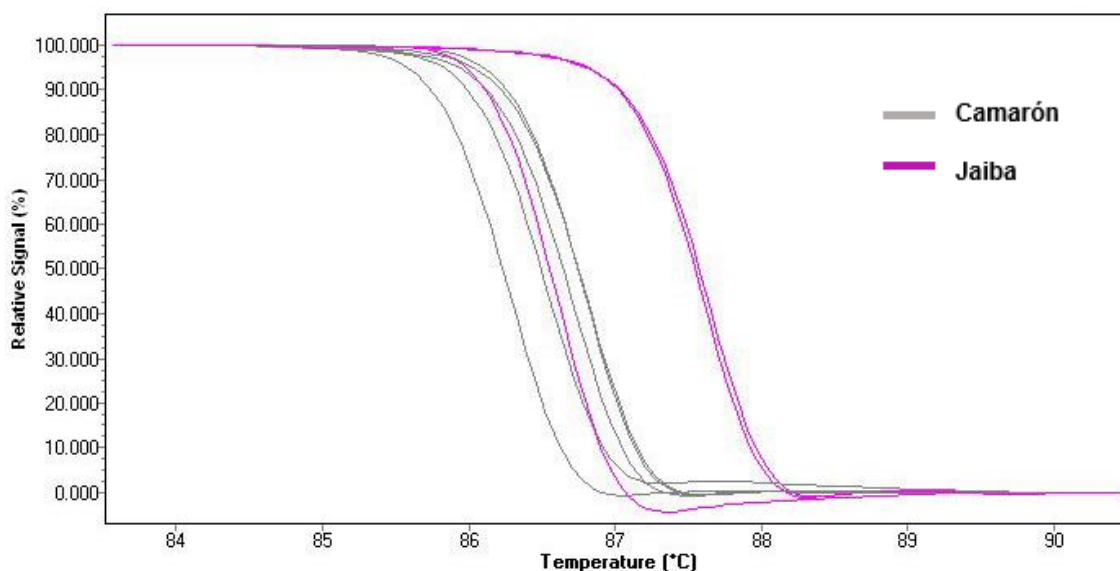


Figura 7. Curvas de Melt obtenidas de las reacciones con ADN de camarón, jaiba e inoculo, donde se muestra en color violeta el comportamiento de la jaiba.

La grafica de *Difference Plot* de la Figura 8 muestra las diferentes señales emitidas a diferentes temperaturas, se puede observar claramente como en un mismo punto de temperatura se desarrollan diferentes señales emitidas, lo cual indica que se están replicando diferentes genotipos del virus WSSV, ya que un mismo genotipo replicaría una misma señal en las diferentes reacciones a una misma temperatura (Gallego y Arjona, 2012).

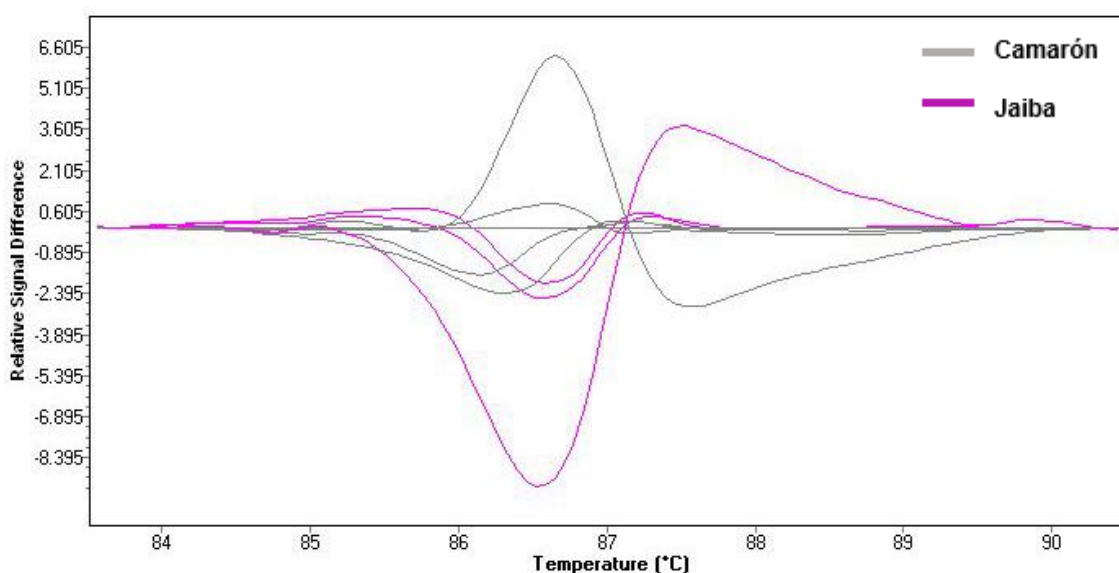


Figura 8. Diferentes señales emitidas de las muestras de camarón, jaiba e inculo a un aumento de temperatura constante.

En la Figura 9 se muestra de *Melting Peaks* se muestran los picos de desnaturalización, se observa cómo es que si existe una diferencia de ADN de muestras de camarón con respecto a las de jaiba, ya que la fluorescencia es emitida al desnaturalizarse las cadenas de ADN a cierta temperatura, un mismo genotipo necesita una misma temperatura para separar su cadena es decir que en la imagen claramente se necesitó más de una temperatura y por lo tanto se tiene más de un genotipo de WSSV amplificado por el método HRM (Gallego y Arjona, 2012).

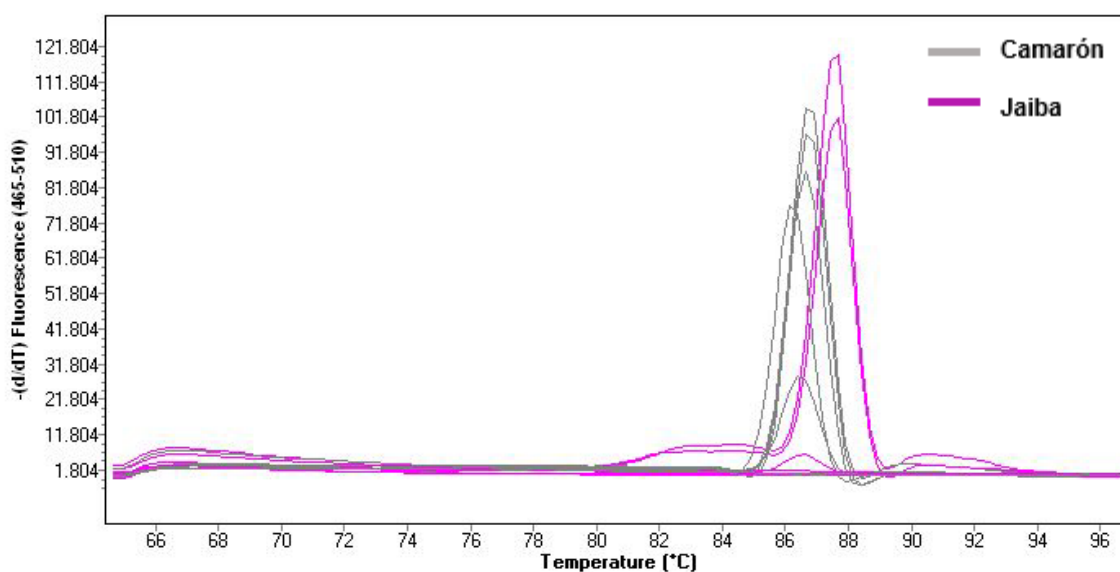


Figura 9. Picos de desnaturalización del camarón, jaiba e inóculo.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio de extracción de ADN de camarones y jaibas infectadas con el mismo inoculo del virus y a las mismas condiciones ambientales, se concluye lo siguiente:

En la prueba con el ORF 94 en el análisis del gel de agarosa no se encontraron diferentes cepas del virus de mancha blanca ya que este análisis es más visual y menos detallado.

Con el método de prueba de HRM, este fue el más detallado, se encontraron diferencias o cambios en el gen vp28 del virus de mancha blanca entre muestras de camarones y jaibas infectadas con el mismo inoculo viral, lo que nos sugiere que el gen de vp28 puede mutar al cambiar de hospedero ya que es un gen que codifica para la principal proteína estructural de virus y que interviene en la infección de dicho patógeno. La concentración utilizada para el volumen de reacción de cada una de las muestras fue suficiente para obtener resultados y se puede decir que el virus si presenta diferentes genotipos o mutaciones genéticas al pasar de un crustáceo a otro, en este caso de camarón a jaiba.

Es recomendable seguir con la investigación, realizando de nuevo el experimento y utilizando la HRM como prueba principal para analizar las extracciones de ADN de las muestras con una mejor definición y detallado.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Centro Nacional de Servicios de Constatación en salud animal (2011) “CURSO DE SANIDAD E INOCUIDAD ACUICOLA Y PESQUERA”, Jiutepec, Morelos, pp. 1-26.

Escobedo-Bonilla, C. M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, M. B., y Nauwynck, H. J. (2005). “In vivo titration of White spot síndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes”, INVE technologies, Bélgica, Dis Aquat Org 66: 163–170

Espinosa Asuar L. (2007) “Guía práctica sobre la técnica de PCR”. En: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). “*Ecología molecular*”. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., México, pp. 517-526.

Fernández Ordenes J., Olivares Vicencio B., Ulloa Urrutia S. (2013) “Documentos Técnicos para el Laboratorio Clínico. Recomendaciones para Laboratorios que Realizan la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Áreas y Flujos de Trabajo.” Departamento Laboratorio Biomedico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile, pp. 3-4.

Galaviz S. L., Reyes González G. J., Cuauhtémoc Ibarra G. J., Mercado H. R., Zinnia J. Molina G. (2009) “Minisatélites del virus del síndrome de la mancha blanca (Whispovirus) en México”. CIENCIA UANL/ VOL XII, No. 2, pp. 169-173.

Gallego F. y Arjona R. (2012) “Análisis de Variación génica mediante el método HRM (High Resolution Melting)” Unitat Científicotécnica de Suport Vall d’Hebron Institut de Recerca (VHIR) Hospital Universitari Vall d’Hebron, pp. 2-6.

Hoa, T.T., R A. Hodgson, D.T. Oanh, N. T Phuong, N. J Preston and P.K. Walker. (2005). “Genotypic variations in tandem repeat DNA segments between

ribonucleotide reductase subunit genes of Whipe Spot Syndrome Virus (WSSV) isolates from Vietnam”, Diseases in Asian Aquaculture V, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 339-351.

Invitrogen, E-Gel® Technical Guide (2008) “General information and protocols for using E-Gel® pre-cast agarose gels” Version K, December 12, 25-0645.

“La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR.” (Enero – Febrero, 2009) No.3, Microbial. <http://www.microbial-systems.com>

Medina Walteros J., Garzón Urrego F., Tafurth Montoya P., Barbosa Suarez J. (2012) “Recopilación Bioinformatica” Universidad Distrital Francisco José de Caldas, pp. 35-36.

Morales Sánchez D. y Gallo Ramírez L. E. (2006) “Métodos Físico-Químicos en Biotecnología: Plataformas de Proteómica”, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos, pp. 3-14.

Müller H. and Schweizer B. (1996). “Biochemical applications for uv/vis spectroscopy: DNA, protein, and kinetic analysis”, Perkin Elmer, Inc, UK pp 29-30.

Sánchez-Paz A. (2010) “White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern” Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste (CIBNOR), Laboratorio de Análisis Integral Acuícola, Hermosillo, Sonora, México, pp. 3-22.

Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. (2013) “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real”, Investigación en Discapacidad, Núm. 2, pp. 70-78.

Tang, K. F., Navarro, S. A., Pantoja, C. R., Aranguren, F. L., & Lightner, D. V. (2012). “New genotypes of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) from the Kingdom of Saudi Arabia.”, Diseases of aquatic organisms, Vol. 99: 179-185.

Terán Díaz S. (2012) “Evaluación del zooplancton como vector del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)”, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Área de Conocimientos de Ciencias Del Mar, Departamento Académico de Biología Marina, La Paz, B.C.S., pp. 1-18

Torres Tejada A. G. y Eugenia Baca B. (1995) “Reacción en cadena de la polimerasa”, Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, Elementos, No.23, vol.3, pp. 16-21.

Thermo SCIENTIFIC (2009) “NanoDrop 2000 User Manual” NanoDrop Spectrophotometer, V1.0 User Manual, pp.1-5.