



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
XOCHIMILCO



# Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico



SEPTIEMBRE 2006

AÑO. 9 Vol. III No. 35

## DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN ORGANISMOS ACUÁTICOS CULTIVADOS, MÁS QUE UNA TÉCNICA

Jorge Cáceres Martínez, Rebeca Vásquez Yeomans y Adrián Mauricio García Ortega

Con el descubrimiento en 1969 de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, en Yellowstone, EUA por Thomas Brock y Hudson Freeze, se abrió la puerta a uno de los avances biotecnológicos más importantes del siglo XX. Esta bacteria es capaz de sobrevivir a temperaturas de entre 50 y 80° C lo que le permite ser una fuente de enzimas termoestables, entre ellas una ADN (ácido desoxirribonucleico) polimerasa, llamada *Taq* DNA-polimerasa o simplemente *Taq* polimerasa, derivado del nombre científico de la bacteria.

La replicación del ADN depende del uso de una polimerasa que sintetice una nueva cadena de ADN a partir de un molde. La enzima *Taq* polimerasa necesita un punto de inicio para la síntesis que consiste en una doble cadena de ADN. Este punto es determinado por un iniciador (también conocido como oligonucleótido o "primer") que es una fracción corta de ADN que se adherirá por complementariedad al segmento de interés.

Con estos principios nace la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Saiki *et al.*, 1985), conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction) por sus siglas en inglés para obtener millones de copias de un fragmento de ADN particular partiendo, en teoría, de una única copia de ese fragmento. Esta técnica se convierte entonces en la principal herramienta de la biología molecular y supone un enorme avance para la ciencia, haciendo acreedor al premio Nobel en Química a Kary Mullis en 1993. Lo novedoso de la técnica y sus aplicaciones han favorecido la formación de una gran cantidad de profesionales que utilizan y desarrollan la PCR y la incorporación de la misma en los programas de estudio de las áreas biológicas.

Entre las aplicaciones de esta técnica está el identificar a patógenos como virus, bacterias y protozoarios con una alta probabilidad, dada su sensibilidad y especificidad, a partir de cantidades mínimas de su ADN.

Evidentemente, este hecho a nivel mundial impacta directamente sobre el diagnóstico tradicional de agentes causales de enfermedades dando una nueva y poderosa herramienta para el control sanitario en el ámbito humano, agropecuario y acuicola-pesquero. El valor agregado de quien conoce y en el mejor de los casos, domina esta técnica, aumenta de manera inmediata y todas las agencias y laboratorios involucrados en el control sanitario buscan el apoyo de especialistas en biología molecular para implementar la técnica de la PCR y sus variantes (PCR anidada, PCR en tiempo real, Transcripción inversa-PCR, PCR Múltiplex, RAPD entre otras). De esta forma, aumentan las ofertas de diagnóstico y los estándares de calidad obligan a que los laboratorios y agencias involucradas en la sanidad acuicola cuenten con diagnósticos de agentes patógenos por PCR que vienen a enriquecer y complementar su batería de técnicas de diagnóstico.

En contraparte, y en particular en el sector acuicola-pesquero de México, a partir de la difusión de la PCR las técnicas convencionales de identificación como la bacteriología clásica, el análisis parasitológico, el análisis histopatológico, inmunohistoquímica, entre otras, se comenzaron a ver como obsoletas, poco confiables y hasta en franca desaparición. Esta concepción se agudiza aún más, por el simple hecho de contar con muy pocos patólogos con experiencia que pudieran equilibrar la balanza de la percepción sobre los alcances de la nueva técnica y su aplicación en el estudio de las enfermedades, es decir, en la patología (pathos = enfermedad, logos = tratado o estudio). Ante estas condiciones de visión superficial de la patología, se comienza a difundir que el conocer las técnicas de diagnóstico molecular son el principio y el fin de la patología acuicola. Se desencadena entonces una feroz competencia entre laboratorios y centros de investigación por demostrar que se cuenta con el dominio de un método de PCR específico a cierto patógeno y se difunde que el ser patólogo es sinónimo de implementar la técnica de la PCR para algún agente patógeno conocido. La analogía, respecto al diagnóstico de enfermedades en patología humana, de una visión tan superficial y nociva, sería el creer que todas las técnicas de diagnóstico en patología humana se desecharan por contar ahora con la PCR o que ser médico es igual a ser especialista en diagnósticos por PCR. El patólogo se basa en mucho más que una técnica para hacer

su labor, y el estudio de las enfermedades es mucho más que el diagnóstico de algún agente patógeno por una sola técnica por poderosa que esta sea.

El enfoque superficial y avasallador ha conducido a un sinnúmero de errores de diagnóstico *per se*, errores de interpretación, errores de aplicación de los resultados obtenidos que han traído como consecuencia una pérdida de confianza en los laboratorios de diagnóstico por parte de algunos productores y pérdidas económicas para todo el sector acuícola.

Actualmente no es necesario convencer a los patólogos y en general, a los biólogos, sobre la necesidad de incorporar a su bagaje de técnicas de estudio, las técnicas de biología molecular, que, como hemos dicho, hoy por hoy son materia de estudio obligada en las licenciaturas en ciencias médico-biológicas. Lo que resulta imperante es conocer sus limitaciones, conocer la pertinencia de su aplicación e interpretar correctamente sus resultados. En este sentido, a continuación se presentan una serie de ejemplos de errores en cuanto a la percepción de alcances y limitantes de la PCR, que frecuentemente conducen a errores de diagnóstico e interpretación usando técnicas moleculares sin considerar criterios más amplios e insustituibles de la patología general y patología acuícola en lo particular.

#### **Pertinencia de la aplicación de una PCR específica.**

Se puede contar con el mejor personal especializado para detectar un patógeno en particular, pero su aplicación no tiene sentido si la especie hospedera en cuestión no es blanco de dichos parásitos o no es susceptible a los mismos. Tampoco tiene sentido su aplicación si no se conoce la biología del hospedero y del agente causal. Resulta peor aún si se desconoce la posición taxonómica del hospedero. ¡Han ocurrido casos en que enfermedades infecciosas específicas de moluscos gasterópodos se consideran en la oferta de diagnóstico y estudio para enfermedades infecciosas de moluscos bivalvos! Sólo porque aparecen en la lista general de enfermedades de Sanidad Acuícola (OIE) y de esta manera impresionar a los usuarios potenciales del diagnóstico.

**Tamaño de muestra.** Un tamaño de muestra pequeño, puede arrojar resultados falsos negativos por PCR. Si la presencia de un patógeno determinado en una población es cercana al 0.1%, una muestra de 100 individuos ofrece tan solo una posibilidad del 9.5% de incluir un solo animal infectado. Un tamaño de muestra de 1,000 ejemplares ofrece una posibilidad del 63%. Se requeriría un tamaño de muestra de unos 10,000 ejemplares para que la probabilidad de incluir y detectar la presencia del patógeno en dicha muestra fuera del 99.9% si es que se tomara correctamente el tejido blanco infectado y si la PCR se realizara con todos los controles necesarios. Si este aspecto se toma a ciegas, "porque cuento con la mejor PCR", sería tomar el camino equivocado con el consiguiente costo.

Para el análisis de lotes comerciales es imprescindible la consideración de otras herramientas del patólogo para llegar a un diagnóstico confiable a un costo razonable. Entre ellas, conocer el origen de la muestra y el historial de enfermedades infecciosas en dicho origen (considerando también la clasificación de zonas de la OIE); conocer la etiología de la enfermedad del patógeno en cuestión y los tejidos blanco; tener en cuenta el análisis en fresco previo, utilizar técnicas presuntivas de diagnóstico y muestreos dirigidos. A partir de este tipo de criterios, es posible recomendar un tamaño de muestra confiable y económicamente aceptable.

**Interpretación de resultados de una PCR.** Si no se conoce la biología, fisiología y anatomía del hospedero, así como la condición del organismo al momento del muestreo, la conservación de la muestra, los tejidos blanco, la biología del parásito, el ambiente y la interacción entre ambos, así como la etiología de la presunta enfermedad infecciosa se puede llegar a otros absurdos. Un ejemplo dramático es el uso del macerado total del hospedero para la extracción de ADN genómico y usarlo en la prueba de una PCR específica y dar una alarma porque se han detectado bacterias entéricas o alguna especie del género *Vibrio* sin que se haya demostrado la patogenicidad de dicha bacteria en ese hospedero. Por esto, es fundamental el conocer los principios patológicos básicos de la acción oportunista de un sinnúmero de bacterias, de la existencia de cepas o variedades patógenas y no-patógenas de ciertas bacterias, del comportamiento probiótico de algunas bacterias que son patógenas para ciertos hospederos y en ciertas condiciones, de los tejidos blanco de ciertos patógenos, de la flora bacteriana natural del tracto digestivo del hospedero, etc. En este ejemplo también es básico considerar el proceso de toma de muestra.

La otra cara de la moneda es que por falta de conocimiento de los fundamentos moleculares, se llegue a aseverar por ejemplo: la presencia de un agente causal de una enfermedad infecciosa certificable conocida, porque se obtienen fragmentos de ADN con número de bases iguales o cercanos a los esperados de acuerdo con los iniciadores utilizados, ¡Sin incluir controles positivos y negativos en la prueba! Es incorrecto detectar la presencia de un agente causal sin el uso de controles y sin contar con la secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos.

Adicionalmente, existen una serie de limitantes propias de la técnica de la PCR que si no se conocen y no se toman las acciones correctivas pertinentes, pueden dar como resultado falsos positivos o falsos negativos y a continuación mencionaremos tan solo algunos de ellos.

La **degradación y/o contaminación** por inhibidores de la PCR del ADN son algunos de los problemas comunes que dan como resultado falsos negativos.

**Componentes de la reacción.** Un punto crítico en la PCR son las concentraciones del cloruro de magnesio y de los desoxribonucleótidos trifosfatados (dNTP = dATP + dTTP + dGTP + dCTP). La ADN polimerasa es dependiente del ión  $Mg^{2+}$  y su papel en la amplificación es actuar como cofactor enzimático. Para la optimización de esta técnica se utiliza un rango de 0.5 a 2.5 mM. Dependiendo del tipo de ADN blanco, una cantidad elevada traerá como consecuencia una actividad inespecífica de la enzima, lo que puede dar lugar a la amplificación de fragmentos no esperados. Otro factor importante son los errores en el pipeteo de micro-volúmenes de *Taq* polimerasa.

**Concentración de ADN blanco.** Es importante considerar la cantidad de ADN blanco. Muy poco (picogramos o femtogramos) puede dar resultados negativos y una cantidad excesiva puede inhibir la reacción. La extracción de ADN genómico también puede representar un problema, porque existen varios protocolos a seguir y cada uno tiene un rendimiento diferente. Cuando se considera la cantidad de ADN a emplear, hay que tomar en cuenta el tamaño del genoma y del segmento a amplificar.

**Contaminación en la PCR.** Como hemos mencionado, la PCR es una poderosa herramienta para la amplificación del ADN. Teóricamente es capaz de detectar una única copia del ADN molde produciendo, aproximadamente,  $1 \times 10^{12}$  copias (dependiendo del número de ciclos) de la secuencia seleccionada en pocas horas, la técnica puede ser víctima de su propio éxito. Todos los productos de la amplificación por PCR son candidatos importantes para la re-amplificación y podrían, potencialmente, producir resultados falsos positivos si es que no se excluyen de subsecuentes amplificaciones.

Para detectar errores del técnico o de equipo, cada muestra debe ser analizada por duplicado, desde el principio hasta el final. Si no coinciden los resultados de ensayos por duplicado, se deberá repetir el procedimiento entero. Además deben considerarse los resultados del diagnóstico general y del o de los diagnósticos presuntivos previos.

Se requiere la verificación de todos los métodos analíticos nuevos. Es fácil recurrir a un banco de datos de secuencias de ADN y designar iniciadores que en teoría deben detectar un patógeno determinado. Es de suma importancia validar la eficacia de nuevos juegos de iniciadores utilizando muestras verificadas del patógeno blanco. Sólo ello nos permite confiar en nuestros métodos.

Aún tomando todas las precauciones, controles del caso, estandarización de la técnica, y teniendo al mejor personal científico calificado en el área de biología molecular, el abanico de posibles fallas en la PCR es muy importante y nos obliga a recurrir a otro tipo de controles, es decir, apoyarnos en el diagnóstico convencional y en el criterio amplio de la patología. El análisis riguroso del resultado de

una PCR, positivo o negativo, sólo será confiable si el análisis en fresco, el análisis parasitológico convencional, el análisis histopatológico o cualquier análisis presuntivo, previamente nos ha obligado a buscar su confirmación. Visto al revés, confirmar el resultado de la PCR con las técnicas convencionales realizadas previamente. Para enfermedades infecciosas de importancia (listadas por la OIE, listadas por legislación nacional o, bajo un criterio patológico, de alto riesgo), se requiere de una verificación en ambos sentidos. También es fundamental manejar los criterios patológicos, biológicos y ambientales que influyen en las enfermedades para una aplicación correcta de las técnicas. No por nada la OIE, considerando el criterio patológico maneja, en algunos casos, los resultados de PCRs específicas como confirmativos y en otros como presuntivos. Además, hay que subrayar que existen otras técnicas confirmativas, también muy poderosas como son la microscopía electrónica, hibridación *in situ*, secuenciación y el uso de anticuerpos.

En la Tabla 1 se resume la aplicación correcta de técnicas generales, presuntivas y confirmativas según la OIE para las enfermedades de moluscos bivalvos listadas por dicha institución. Adicionalmente, cada laboratorio puede contar con diagnósticos presuntivos y confirmativos propios que den más certeza a su trabajo y garantías a los usuarios. Ha sido común el recibir llamadas respecto a resultados de PCR deslizando preguntas o comentarios para corroborarlos "¿Cómo te fue con tu análisis histopatológico?" para poder confirmar sus propios resultados a partir de técnicas que, bajo un enfoque superficial, estarían en desuso.

**Tabla 1.** Clasificación de las técnicas de diagnóstico para las enfermedades de moluscos bivalvos consideradas por la OIE

Enfermedad Agente Causal	MÉTODO DE DIAGNÓSTICO		
	General	Presuntivo	Confirmativo
<b>Bonamiosis</b> <i>Bonamia ostreae</i> , <i>B. exitiosus</i> y <i>Mikrocytos</i> <i>roughleyi</i>	Histología Impronta	Histopatología Impronta	Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)
<b>Haplosporidiosis</b> <i>Haplosporidium</i> <i>nelsoni</i>	Histología	Histología PCR	Hibridación In Situ
<b>Marteiliosis</b> <i>Marteilia</i> <i>refringens</i> , <i>M.</i> <i>sydneyi</i> , <i>M.</i> <i>maurini</i>	Histología	Histología Impronta	Hibridación In Situ PCR-RFLP Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)
<b>Mikrocytosis</b> <i>Mikrocytos</i> <i>mackini</i>	Histología	Impronta	Histología Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)
<b>Perkinsosis</b> <i>Perkinsus</i> <i>marinus</i> , <i>P.</i> <i>olseni/atlanticus</i>	Cultivo en Tioglicolato Histología	Cultivo en Tioglicolato Histología Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) PCR	Secuenciación de la región ITS
<b>SSO Disease</b> <i>Haplosporidium</i> <i>costale</i>	Histología	Histología PCR	Hibridación In Situ

Las poderosas técnicas de diagnóstico por PCR y sus variantes representan un avance científico y tecnológico sin precedentes y, con absoluta seguridad, muchas de sus posibilidades de error durante su aplicación se irán corrigiendo. Sin embargo, no dejarán de ser una herramienta más para el estudio de las enfermedades que vienen a dar mayor certidumbre a los diagnósticos y estudios en materia de Patología, pero hay que darles su justo contexto. El diagnóstico de enfermedades de organismos acuáticos es más que una sola técnica y la patología acuícola es mucho más que el diagnóstico de enfermedades. Un enfoque realista y con base en la experiencia patológica, permitirá fortalecer el control sanitario del sector acuícola de nuestro país aplicando, pertinentemente, las variadas técnicas y fundamentos de que dispone el patólogo.

#### LITERATURA CITADA

Chien, A., Edgar, D. B. y J. M. Trela. 1976. Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127 (3): 1550-1557.

Lofish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y J. Darnell. 1999. *Molecular cell biology*. Fourth Edition. W. H. Freeman and Company. 1084 pp.

OIE. 2003. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Internet: [http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm)

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. y N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732): 1350-1354.

Saunders, G. C. y H. C. Parkes. 1999. *Analytical molecular biology, quality and validation*. LGC, Reino Unido. 190 pp.

### IMPORTANCIA DEL MUESTREO Y ANÁLISIS INDIVIDUAL EN LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL BAGRE DE CANAL (CCVD)

Gabriel Aguirre Guzmán y J. Genáro Sánchez Martínez

#### RESUMEN

La detección de una enfermedad o agente patógeno en los organismos acuáticos está relacionada no sólo en el proceso de detección del agente en el laboratorio, sino también con el adecuado método de muestreo y tamaño de muestra correspondiente. Cuando estos elementos no logran conjuntarse como es debido, se dificulta y entorpece el proceso para la detección de una enfermedad y su posible control.

El objetivo del presente trabajo fue el de demostrar cómo pueden variar los resultados cuando se realizan estudios individuales por unidad de muestreo, empleando para este fin un cultivo de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) en jaulas como modelo de prueba. Se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la presencia y/o ausencia del virus del bagre de canal (CCVD). Se determinó por medio de esta técnica que no todas las jaulas muestreadas poseen organismos portadores del CCVD, además de que el uso de cebadores anidados (nested primers) puede detectar organismos portadores del virus y que son asintomáticos.

Esto señala la importancia que tienen para los acuicultores invertir en la realización de estudios por unidad de muestra (jaula, estanque, pileta etc.) que en caso contrario, cuando las muestras se mezclan para hacerlas representativas de toda una granja, se puede llegar a la conclusión errónea que todos los organismos de la misma están infectados o son portadores de este virus, con sus respectivas consecuencias.

#### INTRODUCCIÓN

La enfermedad del virus del bagre de canal es generada por un importante agente patógeno, el cual puede afectar a estos organismos en niveles altos cuando se encuentran durante su periodo de vida como alevín. La enfermedad es causada por un tipo de herpesvirus (Figura 1) denominado como Ictaluride herpesvirus 1 (134 bp de tamaño) por el Comité Internacional de Taxonomía Viral, el cual puede ser transferido vertical y horizontalmente.

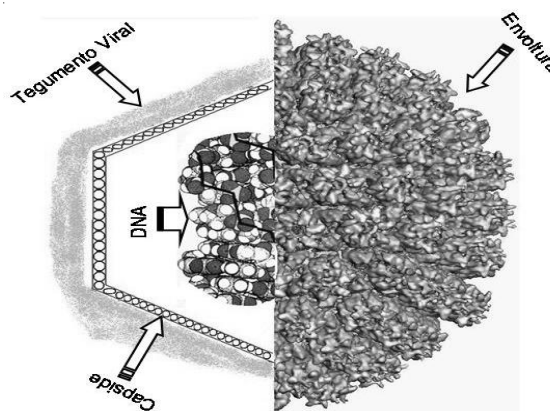


Figura 1. Estructura típica de un herpesvirus

Los signos clínicos de esta enfermedad incluyen hemorragias, nado errático, exoftalmia y abdomen distendido. La evaluación histológica muestra necrosis y hemorragias extendidas en órganos vitales, especialmente en hígado, riñón, y tracto gastrointestinal. Los daños más evidentes se pueden observar en el riñón, en donde se presenta una extensiva necrosis de los túbulos renales y tejido intersticial. Una mortalidad masiva puede presentarse al poco tiempo de aparecer los signos externos de la

enfermedad. Esta mortalidad se observa principalmente en la fase de alevín y/o en tallas de 6 pulgadas de los bagres. Los organismos sobrevivientes de la enfermedad se vuelven portadores latentes del virus. Durante este estado, el virus no es detectable por histología, cultivo celular, y pruebas inmunológicas, sólo es factible detectarlo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, no todos los protocolos de PCR para la detección de CCVD son igualmente efectivos o sensibles.

La detección de un agente patógeno en un cultivo de organismos acuáticos involucra un adecuado muestreo, tamaño de muestra, y transporte de la misma. La toma de muestra debe realizarse con redes adecuadas, siendo estas desinfectadas cada vez que son trasladadas a otros estanques o jaulas. Esto evita el paso accidental de un agente patógeno de un área de cultivo a otra y una contaminación accidental de las muestras. Estas deben ser transportadas bien etiquetadas y sin que existan problemas de identificación de la procedencia de la misma. Preferentemente, nunca deben usarse los mismos contenedores para transportar muestras procedentes de distintos estanques o granjas.

La Tabla 1 se señala el tamaño de muestra que debe ser obtenida para poder detectar la presencia de una enfermedad o de un agente patógeno en organismos acuáticos. El objetivo del presente trabajo es mostrar cómo pueden llegar a variar los resultados en la detección del virus CCVD al muestrear de forma individual las jaulas de cultivo de bagre de una granja.

**Tabla 1.** Tamaño de muestreo requerido asumiendo un grado de infección mínima del 2%

Tamaño de la población	Porcentaje de Error						
	2	5	10	20	30	40	50
50	50	35	20	10	7	5	2
100	75	45	23	11	9	7	6
250	110	50	25	10	9	8	7
500	130	55	26	10	9	8	7
1000	140	55	27	10	9	9	8
1500	140	55	27	10	9	9	8
2000	145	60	27	10	9	9	8
4000	145	60	27	10	9	9	8
10,000	145	60	27	10	9	9	8
>10,000	150	60	30	10	9	9	8

## MATERIAL Y MÉTODO

### Muestras

Se utilizaron muestras provenientes de una granja con organismos de diferentes tallas mayores a 6 pulgadas, los cuales no presentaban signos de enfermedad del virus del bagre de canal. Se usaron organismos de granja que fueron evaluados anteriormente como negativos (de talla mayores a 8 pulgadas) y positivos (2 pulgadas de talla) como controles. Los bagres fueron transportados vivos en bolsas de plástico con oxígeno, en hieleras de poliestireno y con

agua de la propia granja. Estos animales fueron llevados al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAT. Los bagres fueron seleccionados al azar y disectados, siendo los riñones procesados para realizar con ellos los estudios individuales por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A los organismos de una talla de 2 pulgadas, les fue retirada la cabeza y parte de la cola, dejando intacto los tejidos del abdomen, cada una de las muestras fueron preservadas individualmente en tubos Eppendorf de 1.5 ml, estériles y libres de nucleasas y congeladas a -20 °C. A los organismos de 6" (controles y organismos experimentales), les fue retirado el riñón, siendo este tejido conservado de forma similar a la señalada anteriormente. El DNA viral fue obtenido a partir de tejido de 5 organismos que fueron seleccionados al azar, siendo la extracción y purificación de este DNA realizada conforme a lo descrito por el protocolo comercial de aislamiento de DNA de Promega (Wizard® SV Genomic DNA Purification Kit. Madison, WI., USA). Se usaron tres pares de cebadores (primers), en dos protocolos de PCR, los cuales están representados en la tabla 2. Los reportados por Baek y Boyle (1996) se usaron en un PCR con cebadores anidado para la detección de CCVD siguiendo el protocolo descrito por los autores. El tercer par de cebadores para CCVD se usó en un PCR realizado conforme a lo descrito por la OIE (2003).

Para cada prueba se usó un perfil térmico de 30 ciclos, consistentes en una desnaturalización a 93°C por 30 s, anillamiento a 60°C por 30 s, y extensión a 72°C por 30 s. El producto de esta reacción (5 µl) fue separado electroforesis en un gel de agarosa al 1%, el cual fue teñido con bromuro de etidio para su posterior visualización con luz ultravioleta. Un producto de 136 bp es considerado como positivo para la presencia de CCVD en las muestras (OIE 2003).

**Tabla 2.** Cebadores (primers) empleados por el Laboratorio de Biología Molecular (FMVZ-UAT) para la detección del virus de bagre de canal (CCVD) en *I. punctatus*

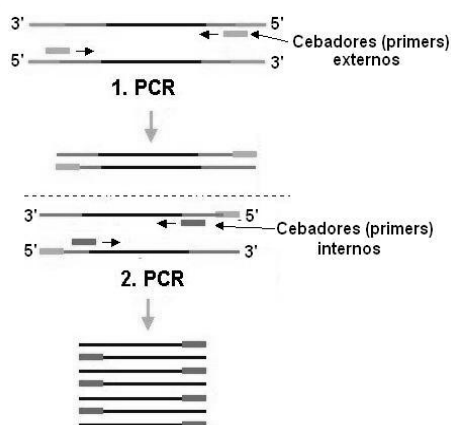
Cebadores	Secuencia (5' -- 3')	Referencia
1 CCVf CCVr	ACG-TGT-ATC-ACG-GTC-TCA-CT TTC-GAG-AAT-CGG-GTC-TCT-GT	Baek Y.S., Boyle J.A. 1996. Detection of channel catfish virus in adult channel catfish by use of nested polymerase chain reaction. J. Aquat. Anim. Health, 8, 97-103
2 CCVif CCVir	TTC-TTC-CTC-CTC-GTC-TCT-TC AGA-ACC-TCG-GGA-GTA-GAG-CC	
3 OIEf OIEr	TCA-TCC-GAA-TCC-GAC-AAC-TGA CCA-AGA-TCG-CGG-AGA-AAC	CCVD. 2003. In: Organización Mundial de Sanidad Animal (Ed). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 4th Edition.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de PCR y la sensibilidad que poseen sus respectivos protocolos, han hecho que este método sea uno de los más utilizados para identificar específicamente a los agentes patógenos que se encuentran en un organismo.

El PCR involucra la amplificación de una parte del la secuencia genética existente en las muestras, cuando los cebadores (primers) están bien diseñados, el producto es único y específico para el agente que deseamos encontrar, en caso contrario pueden darse resultados de falsos positivos o negativos. Sin embargo, la amplificación y duplicación de secuencias de ADN llevadas a cabo en los termocicladores que es una fase obligada del proceso, no se puede realizar indefinidamente ya que de lo contrario se corre el riesgo de obtener secuencias no deseadas. Técnica denominada cebadores anidados (nested primers) es un protocolo muy poderoso que involucra dos reacciones sucesivas de PCR, con dos pares de cebadores distintos, de tal modo que los cebadores utilizados en el segundo PCR (internal o nested PCR) flanqueen una región genómica amplificada en la primera reacción en cadena (external PCR) (Figura 2). Este método se utiliza cuando se tienen pequeñas cantidades del ADN de interés o se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas, siendo por lo tanto un protocolo mucho más sensible que el PCR tradicional que solo usa un solo par de cebadores.

La Tabla 3 muestra los resultados en la detección de CCVD en las diferentes jaulas. Claramente se observa la diferencia que puede encontrarse en las distintas muestras. Los organismos provenientes de las jaulas 2, 8, 9 dieron resultados negativos a la presencia de CCVD con los tres tipos de cebadores, mientras que los organismos provenientes de las jaulas 1, 3, 4, 5, 7, 10, 11-13 fueron positivos pero solo con el cebador anidado (2). Solo la jaula 6 fue positiva para dos de los tres tipos de cebadores.



**Figura 2.** Esquema típico para la obtención de un producto de PCR por medio del uso de cebadores anidados (nested primers)

Estos resultados sugieren que el cebador anidado es el más sensible de los tres tipos de cebadores (primers) logrando detectar a los animales que son portadores del virus. El cebador 3 es el proveniente de la OIE y esta organización determina que este cebador es capaz de detectar el virus cuando el organismo aun no presente síntomas de la enfermedad. Sin embargo, este protocolo no es tan sensible como al usar cebadores anidados.

Jaula	Primers		
	1	2	3
1	-	+	-
2	-	-	-
3	-	+	-
4	-	+	-
5	-	+	-
6	-	+	+
7	-	+	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	+	-
11	-	+	-
12	-	+	-
13	-	+	-
Control +	+	+	+
Control -	-	-	-

**Tabla 3.** Distribución de CCVD en las distintas jaulas de cultivo de bagre de canal *I. punctatus*

**CONCLUSIÓN**

El primer anidado es altamente específico al virus de CCVD, logrando identificar a los bagres que son portadores del virus

El PCR determinó que no todas las jaulas muestreadas poseen organismos portadores del CCVD. Esto señala la importancia que tienen para los acuicultores invertir en la realización de estudios por unidad de muestra (Jaula, estanque, pileta etc.) que en caso contrario, cuando las muestras se mezclan y se desean hacer representativas de toda una granja, se puede llegar a la conclusión errónea que todos los organismos de la misma están infectados o son portadores de este virus, con sus respectivas consecuencias.

Es necesario definir la importancia e implicaciones que puede tener para la acuicultura mexicana el uso de PCR con protocolos de cebadores anidados.

**AGRADECIMIENTOS**

Se agradece a la CONAPESCA por su autorización para poder emplear estos resultados y del apoyo financiero otorgado, vía el programa PRONALSA y al Comité de Sanidad Acuícola de Tamaulipas por el apoyo financiero otorgado. De igual forma se agradece al personal técnico del Laboratorio d Biología Molecular de la FMVZ-UAT por la ayuda brindada en la obtención de resultados y a las autoridades de la misma por los apoyos financieros complementarios para el crecimiento y fortalecimientos de las actividades de sanidad acuícola en la institución.

**LITERATURA CITADA**

Baek Y. S. y Boyle J. A. 1996. Detection of channel catfish virus in adult channel catfish by use of nested polymerase chain reaction. *J. Aquat. Anim. Health*, 8, 97-103

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2003. Channel catfish virus disease. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. 4th Edition.

## HALLAZGO DE *Bothriocephalus acheilognathi* EN CARPAS CULTIVADAS EN MÉXICO

Feliciano Segovia Salina, Fernando Jiménez Guzmán,  
Ma. de la Paz Tijerina Garz y Aracely Alvarado  
Hernández

### INTRODUCCIÓN

México es un país de gran variedad de climas y condiciones ecológicas que le permiten desarrollar diversas actividades productivas. Dentro de estas alternativas se encuentra la piscicultura, actividad que cada día tiene mayor importancia como una verdadera opción para producir en forma controlada, productos pesqueros para autoconsumo (Ojeda *et al.*, 1988). Entre los peces utilizados en la zona del Noreste de México para cultivo se encuentran el "Bagre de Canal" *Ictalurus punctatus*, Rafinesque y la "Carpa Común" *Cyprinus carpio*, Linnaeus, debido a su fácil reproducción y buena adaptación en estanquerías (Galaviz *et al.*, 1990). En particular, la "Carpa barrigona" *Cyprinus carpio*, puede albergar parásitos entre ellos al céstodo *Bothriocephalus acheilognathi*. Este parásito proviene de peces ciprínidos de Asia y se encuentra ampliamente distribuido en Europa y América.

En México, fue introducido en importaciones de China de "Carpa barrigona" en el año de 1965. Causa una enfermedad denominada "botriocefalosis" y se manifiesta por una distensión abdominal, pérdida del apetito, pereza, en ocasiones el pez se presenta emaciado o con una enteritis hemorrágica (destrucción del epitelio intestinal) y retraso en la madurez sexual. Para su diagnóstico se han usado diversas técnicas (Melvin & Brooke, 1971 y Jiménez *et al.*, 1996). Estas técnicas son de apoyo al piscicultor en el diagnóstico presuntivo y confirmatorio de parásitos en general.

### OBJETIVO

Detectar al céstodo *Bothriocephalus acheilognathi* en intestino de varias especies en base a la técnica Hematoxilina de Harris para helmintos y Hematoxilina y Eosina (H/E) para histología.

### IMPORTANCIA

*Bothriocephalus acheilognathi* ocasiona pérdidas importantes aun no bien valoradas por los acuicultores, en los sistemas de producción acuícola.

### ÁREA DE ESTUDIO

El Centro Acuícola de Tezontepec de Aldama (CATA), y Granja Integral de Policultivo de Tezontepec de Aldama (GIPTA) se localiza en el Ejido de Santiago Acayutlan, Municipio de Tezontepec de Aldama, Valle del Mezquital, Estado de Hidalgo, con las coordenadas geográficas: Longitud 99° 17', Altitud 20° 03'. Con una Altitud de 1960 metros sobre el nivel del mar.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los peces fueron capturados al azar directamente de los estanques de los Centros Acuícolas.

El muestreo fue realizado en dos fases: la primera colecta se realizó el 17 de Mayo de 2003 y la segunda se llevo a cabo el 10 de Febrero de 2004. En el lugar se realizó una necropsia de 593 crías de carpa, las cuales 305 provenían del CATA, 236 crías del GIPTA y 49 mas entre juveniles y adultos de diversas especies de carpas, se aislaron las vísceras específicamente intestino. Se tomaron muestras adicionales de otros órganos, sangre y exudados e improntas. Las muestras se colocaron en viales o frascos de plástico de 25 ml con fijador formaldehído al 10% y Davidson (alcohol-formol-ácido acético). Se hicieron hojas de registro únicas como historial de cada hospedero, por estanque de la granja donde se colectaron las muestras. Las muestras de tejidos y órganos se transportaron al Centro Nacional de Sanidad Acuícola (CNSA), de la F.C. B., U. A. N. L., donde se etiquetaron y registraron con un número del CNSA, se colocaron en alcohol al 70% para realizar las técnicas parasitológicas descritas por Lucky (1977) la cual fue modificada para este estudio.

### Técnica de tinción de helmintos

Se aislaron los escólex y proglotidios de los céstodos en cajas de Petri conteniendo agua destilada para lavar el fijador, se fijaron entre dos portaobjetos y después agregar Davidson y teñir con la técnica de coloración de Harris para helmintos, transparentar en Xilol y montar en resina sintética de secado rápido (Entellan).

### Técnica histológica

Muestras de intestino fijadas en formol al 10% y AFA y procesadas por la técnica de Hematoxilina y Eosina (H/E) según Luna (1968).

Para la identificación de los céstodos del género *Bothriocephalus* se usaron criterios propuestos por Hoffman (1998); Jiménez *et al.* (1986a); Jiménez *et al.* (1986); Rodríguez y Contreras (2003).

### RESULTADOS

Para el ordenamiento taxonómico de los principales agentes patógenos encontrados en las crías y reproductores de carpas del Centro Acuícola de Tezontepec de Aldama y Granja Integral de Policultivo de Tezontepec se utilizaron los criterios Yamaguti (1958) y Hoffman (1998).

En los estudios parasitológico e histopatológico se reporta la presencia del parásito intestinal *Bothriocephalus acheilognathi* en las siguientes especies de carpa, "Carpa Barrigona" *Cyprinus carpio*, "Carpa Espejo" *C. carpio specularis*, "Carpa Herbívora" *Ctenopharyngodon idellus*, "Carpa Brema" *Megalobrama amblycephala*.

En el Centro Acuícola de Tezontepec, la incidencia de *Bothriocephalus acheilognathi* es baja, mientras que en la Granja Integral de Policultivo la infección por este parásito intestinal resultó moderada.

**Clasificación**

Clase: Céstoda  
 Orden: Pseudophyllidea  
 Familia: Bothriocephalidae (Blanchard, 1849)  
 Género: *Bothriocephalus* (Rudolphi, 1808)  
 Especie: *acheilognathi* (Yamaguti, 1934).

**Descripción**

Se estudiaron 15 ejemplares entre adultos y juveniles, su escólex elongado ocasionalmente esférico, con dos hendiduras longitudinales o botrios, sin cuello, con segmentación completa, los proglotidios maduros con forma de campana y los grávidos rectangulares. Testículos laterales, bolsa del cirro rodeada por células prostáticas, ovario compacto, sin receptáculo seminal, glándula vitelina continua y cortical, poro reproductor sobre la línea media del cuerpo, huevecillos operculados, no embrionados. Las especies de *Bothriocephalus* sp. y sus hospederos se describe en el Tabla 1 (Figuras 1 - 4).

**Figura 1.** Céstodos de *Bothriocephalus acheilognathi* en la luz intestinal de la Carpa Brema



**Figura 2.** Escólex de *Bothriocephalus acheilognathi*



**Figura 3.** *Bothriocephalus acheilognathi* en carpa barrigona



**Figura 4.** Céstodo *Bothriocephalus acheilognathi* teñido con Hematoxilina de Harris

**Tabla 1.** Relación de las especies de *Bothriocephalus* y sus hospederos

Especie de <i>Bothriocephalus</i>	Hospederos
<i>B. acheilognathi</i>	<i>Mylocheilos caurinus</i> , <i>Ptychocheilus uregonensis</i> , <i>Notemigonus crysoleucas</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Barbas kimberleyensis</i> , <i>Puntius sarana</i> , <i>Gambusia affinis</i> , <i>Gila robusta</i> , <i>Lepidomeda mollispinis</i> , <i>Notropis lutrensis</i> , <i>Plagopterus argentissimus</i> , <i>Rhinichthys osculus</i> , <i>Ptychocheilus lucius</i> , <i>Centrarchidae</i> , <i>Goodeidae</i> , <i>Atherinidae</i>
<i>B. claviceps</i>	<i>Ambloplites rupestris</i> , <i>Anguilla rostrata</i> , <i>Chaenobryttus gluosus</i> , <i>Lepomis gibbosus</i> , <i>L. macrochirus</i> , <i>Micropterus dolomeiui</i> , <i>M. salmonides</i> , <i>Percopsis omiscomaycus</i> , <i>Stizostedion canadense</i>
<i>B. cuspidatus</i>	<i>Perca flavescens</i> , <i>L. macrochirus</i> , <i>Alosa chrysops</i> , <i>Ambloplites rupestris</i> , <i>Aplodinotus gronniensis</i> , <i>Esox lucius</i> , <i>Diodon alosoides</i> , <i>H. tergisus</i> , <i>Hyborhynchus notatus</i> , <i>Ictalurus nebulosus</i> , <i>Lepomis cyanellus</i> , <i>L. gibbosus</i> , <i>L. macrochirus</i> , <i>Lota lota</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Perca flavescens</i> , <i>Percopsis omiscomaycus</i> , <i>Pomoxis annularis</i> , <i>Ptychocheilus oregonensis</i> , <i>Stizostedion canadense</i> , <i>S. ulterum</i> , <i>M. salmoides</i>
<i>B. formosus</i>	<i>Etheostoma nigrum</i> , <i>E. exile</i> , <i>Percina caprodes</i> , <i>Percopsis omiscomaycus</i> , <i>Poecilichthys exilis</i> , <i>Fundulatus notatus</i> , <i>Lepomis cyanellus</i> , <i>Notropis umbratilis</i> , <i>Phenacobius mirabilis</i> , <i>Pimephales notatus</i> , <i>Percina caprodes</i> .
<i>B. rarus</i>	<i>Lepomis macrochirus</i> , <i>Fundulus diaphanus</i>
<i>B. schilbeoidis</i>	<i>Noturus insignis</i>
<i>B. scorpi</i>	<i>Anguilla rostrata</i>
<i>B. speciosus</i>	<i>Etheostoma olmstedi</i>
<i>B. texomensis</i>	<i>Hiodon alosoides</i>

## DISCUSIÓN

Este céstodo es un parásito intestinal de origen asiático, considerado actualmente como cosmopolita, son heteroxénicos y fuertemente eurixénicos al no ser un parásito específico de la carpa *Cyprinus carpio*, también se ha reportado su presencia en otras especies de peces de cultivo, Tabla 1, (Hoffman, 1998).

En México, las especies de peces parasitadas pertenecen a cuatro familias: Centrarchidae, Goodeidae, Atherinidae y Cyprinidae, siendo las dos últimas donde el céstodo esta mejor representado, (Flores *et al.*, 1994). El efecto patológico más importante de este gusano es en alevines y peces jóvenes menores de un año donde ejerce una acción exfoliativa y ocasionalmente puede obstruir la luz intestinal, es importante hacer notar que los hospederos adultos son considerados portadores de la enfermedad. Otros investigadores mencionan que el céstodo *Bothriocephalus acheilognathi* es una especie frecuente de parásito de peces (Rodríguez y Contreras, 2003). En ésta investigación se realizó la técnica de H/E y Hematoxilina de Harris para diferenciar estructuras diagnósticas del escólex y proglótidos. Otros estudios han aplicado la coloración Tricrómica de Manson para mostrar caracteres del escólex en los céstodos *Bothriocephalus* (Vázquez *et al.*, 2004).

El conocer de la morfología básica de los céstodos de ciprínidos es fundamental para lograr un diagnóstico rápido y eficiente de utilidad para el granjero ya que un rápido manejo del problema parasitario redundará en la solución de problemas sanitarios posteriores en su granja piscícola.

## CONCLUSIÓN

Se identificaron estadios maduros del céstodo *Bothriocephalus acheilognathi* en el intestino de la carpa barrigona, carpa espejo, carpa herbívora y carpa brema colectadas en los Centros Acuícolas del Estado de Hidalgo, México, apoyándose en técnicas parasitológicas e histopatológicas.

## LITERATURA CITADA

Flores, C. J., R. Flores- Crespo, F. Ibarra - Velarde. 1994. Botriocefalosis. La teniasis de las carpas y otros peces de importancia economica. CENID - PAVET Folleto Divulgativo No. 3

Galaviz, S. L., G. Sepúlveda, R. H. Mercado, J., H. Martínez, F. S. Segovia. 1990. New localities for monogenic trematodes and other ectoparasites of carp *Cyprinus carpio* and catfish *Ictalurus punctatus* in northeastern Mexico and their relations with some biotic and abiotic factors. The Journal of the Elisha Mitchell Scientific, 106 (3), pp 64-77.

Hoffman, G. L. 1998. Parasites of North American freshwater Fisher. Second Edition. With a foreword by Ernest H. Williams Jr. Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press. USA. pp 493.

Jiménez, G. F., S. L. Galaviz., S. F. Segovia, F. P. Garza, E. P. Wesch 1986. Parásitos y enfermedades en bagre *Ictalurus sp.* Publicación técnica No. 2. Subdirección de Investigaciones Biológicas, UANL.

Jiménez, G. F., Segovia, S. F., Garza, F. M. y Galaviz, S. L. 1996. Manual de Enfermedades Parasitarias de Peces. Publicación Técnica No. 6. Auspiciado por: PRADEPESCA, Convenio ALA/90/9; UNION EUROPEA- OLDEPESCA y SEMARNAP. Pp. 126.

Lucky, Z. 1977. Methods for the Diagnosis of fish Diseases. Translated for the fish and Wild Life Service. USD of the interior, USA. Edited Holfman USA. Pp 94.

Luna, L. G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology (3rd ed.), Mc Graw Hill Book Company, New York. Pp. 258.

Melvin, D. M. y Brook, M. M. 1971. Métodos de Laboratorio para diagnóstico de Parasitosis Intestinales. Primera Edición. Pp. 121- 144.

Ojeda, P. F., Castro y Castro, J. L., Cubria, P. R., Peralta, S., Rivera Álvarez, F. J. y Sosa, O. A. 1988. Manual biotecnológico para el cultivo y reproducción de Ciprinidos en México. Secretaria de pesca. Primera edición. pp 7.

Rodríguez, G. M. y Contreras, G. D. 2003. La botriocefalosis y medidas de prevención. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico. 6 (2): Pp. 9 - 11.

Vázquez, N. R., Ramírez, L. J., Osorio, S. D., Chávez, S. L. A. y Constantino, C. F. 2004. Lesiones causadas por helmintos del aparato digestivo en peces estuarianos de la Laguna Tres Palos, Guerrero, México. Vet. Mex. 35 (4) pp 369.

Yamaguti S. 1958. Sistema Helminthum Vol. II The Cestodes of Vertebrates Interscience Pub. John and Sons N.Y.

## VARIACIONES GENÉTICAS VIRALES Y SUS IMPLICACIONES EN LA DETECCIÓN DE VIRUS Y EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES EN CAMARÓN

*Leobardo Montoya Rodríguez*

El gran crecimiento del cultivo de camarón a nivel mundial ha venido acompañado por una serie de enfermedades de origen viral que representan el principal reto a vencer para la industria camaronícola, que ha sufrido pérdidas cuantiosas debido a ellas. Numerosas acciones han sido implementadas en diferentes países con el fin de evitar la introducción y diseminación de patógenos virales, pero a la fecha el éxito ha sido relativo y la aparición de una nueva enfermedad viral esta siempre en la mente de los productores, investigadores y autoridades nacionales e internacionales relacionadas con la sanidad acuícola.

En México se han creado diferentes estrategias de prevención y control de dichas enfermedades y los siguientes virus han sido considerados como los principales patógenos "excluíbles o no deseados" en los cultivos de camarones peneidos:

1. WSSV. Responsable del Síndrome de la Mancha Blanca
2. TSV. Responsable del Síndrome de Taura.
3. IHNV. Considerado como un Parvovirus sistémico.

4. YHV, GAV, LOV. Grupo de virus genéticamente relacionados y responsables del Síndrome de la Cabeza Amarilla y enfermedad de las branquias.

La adopción de técnicas moleculares como herramientas de detección y diagnóstico en programas de prevención y control, requiere de una adecuada capacitación del personal involucrado, debido a las limitaciones que pueden tener dichas técnicas si consideramos que los organismos pueden sufrir cambios en su material genético y con ello la obtención de resultados falsos negativos. Tales herramientas han sido reconocidas por la OIE para el diagnóstico de enfermedades de organismos acuáticos, así como los principios o bases en las que se apoya el proceso de validación de estos métodos. Sin embargo, no existe un programa nacional de acreditación o certificación formal que asegure que los laboratorios utilicen los procedimientos adecuados.

Las variaciones genéticas son una característica inherente de los organismos vivos y representan un recurso para la selección natural y la adaptación progresiva de las poblaciones a cambios ambientales. A pesar de que los virus son parásitos intracelulares estrictos, continuamente se enfrentan a condiciones adversas para su persistencia, por ejemplo, el evadir los mecanismos naturales de defensa del hospedero, así como la adaptación a uno nuevo, representa una estrategia esencial de "sobrevivencia".

Los patrones de expresión genética y las variaciones alélicas en los hospederos pueden determinar su susceptibilidad a la infección o diferencias en la eficacia de replicación de un determinado virus, representando también un proceso de selección para estos, propiciando por un lado, que solo aquellos que logren evadir las respuestas inmunológicas puedan replicarse y persistir y por otro, la posibilidad de integrarse en el genoma del hospedero representa otra estrategia evolutiva importante de algunos virus.

De esta manera, los "microorganismos" al igual que los organismos superiores, sufren el proceso de variación a través de diferentes mecanismos, lo cual significa que dentro de una misma especie existan "tipos" o cepas diferentes.

Los principales cambios conocidos en la estructura y organización genómica viral, ocurren por:

**a) Recombinación genética:** Se puede definir como el intercambio de genes entre dos moléculas de ADN, lo cual implica la formación de nuevas individuos con características genéticas particulares. Cuando dos cepas de un mismo virus infectan a la misma célula de un hospedero las nuevas partículas producidas pueden ser recombinantes y poseer material genético de las dos cepas originales. En algunos virus este proceso es más frecuente que en otros debido al tipo de material genético que poseen (por ejemplo el virus de la influenza que posee un ARN fragmentado). Se ha reconocido que en los virus se presentan los procesos de duplicación, intercambio y adopción de genes.

**b) Mutación:** Son cambios que ocurren en las secuencias de las bases del ácido nucleico del genoma de los virus y que se mantienen en las nuevas partículas virales al momento de la replicación en una célula permisible. Estas pueden ser natu-

rales o inducidas y los factores ambientales y los errores que se presentan durante la replicación del material genómico, juegan un papel importante.

Esta última es la causa más común de variación genética que se presenta en los virus, sin embargo, las investigaciones recientes reconocen la importancia de la recombinación genética en la aparición de nuevas cepas con diferentes características de virulencia y patogenicidad.

La rapidez y magnitud con la que se replican los virus ocasionan que dichas variaciones tengan implicaciones importantes para el diagnóstico y la epidemiología.

#### Virus de ARN

La alta variabilidad que presentan estos virus ha sido atribuida principalmente a la carencia de la función de corrección en la lectura y edición que caracteriza a las ARN polimerasas, durante la replicación del genoma viral. Se estima que la tasa resultante de la incorrecta incorporación de nucleótidos en los ARN virus, es de entre  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , lo cual representa al menos 1000 veces más que en bacterias y en organismos eucariotes.

Algunas de estas mutaciones son letales y pueden dar como resultado una proteína distorsionada no funcional, otras dan genomas viables que continúan su replicación y contribuyen en el proceso de adaptación de los virus al medio.

Algunos ARN virus pueden sufrir arreglos genéticos que permiten el intercambio de genes o segmentos de genes durante las infecciones mixtas, estas reacomodaciones ayudan a que las combinaciones más eficientes se originen de un pool genético disponible, incrementando el potencial de la "existencia" viral.

Entre los virus de ARN que infectan a camarones peneidos, se encuentran; TSV, YHV, GAV, LOV y el RPS (Rhabdovirus of Penaeid Shrimp). Estos virus, probablemente presenten una alta frecuencia de mutación durante su replicación y puedan tener capacidad para llevar al cabo recombinaciones genéticas.

#### Virus de ADN

Presentan tasas menores de mutación debido a que las ADN polimerasas llevan al cabo funciones de reparación durante la síntesis del ácido nucleico. Sin embargo, Parrish *et al.* (1991), señalan que algunos virus de ADN (como algunos parvovirus), producen factores que suprimen la función de reparación, generando tasas de error similar a los virus de ARN. Se han observado en algunos casos tasas de mutación de aproximadamente 0.05 % por año. También se conocen virus que producen duplicaciones de secuencias y la presencia de insertos pertenecientes al ADN del hospedero dentro de su genoma.

Entre los virus de ADN que infectan a camarones peneidos, se encuentran; WSSV, IHNV, MBV (Monodon Baculo Virus), BMNV (Baculoviral Midgut Necrosis Virus), SMV (Spawner Mortality Virus) y HPV (Hepatopancreatic Parvovirus Virus).

### Implicación en la detección de virus y en el diagnóstico molecular de enfermedades

El uso de métodos moleculares para el diagnóstico de una enfermedad o para la detección de un virus específico, exige una gran responsabilidad, debido los cambios o variaciones genéticas que pueden darse en los diferentes virus por:

1. Mutaciones en la secuencia de nucleótidos en la región que se pretende amplificar por PCR, y ocasionar que no exista el reconocimiento de los primers, producir un pegado no específico o impedir la extensión de la secuencia.
2. Inserciones o duplicaciones en las secuencias que pueden generar variaciones en el tamaño del producto de PCR, ocasionando un resultado falso negativo en la interpretación del gel ya que generalmente no se realiza secuenciación de los productos obtenidos.
3. Variaciones a nivel de proteínas por mutaciones y otras variaciones en secuencias pueden afectar el reconocimiento de anticuerpos monoclonales.
4. Nuevas cepas con propiedades biológicas particulares como patogenicidad, tropismo tisular o diferente rango de hospederos, que puede provocar confusiones en el diagnóstico de una enfermedad.

El entendimiento de estos factores es importante en la adecuada interpretación de la información para el diagnóstico de la enfermedad, en investigaciones epidemiológicas o para programas de certificación. Para un diagnóstico adecuado también se requiere: conocer la enfermedad y los signos característicos, utilizar las pruebas de diagnóstico adecuadas, utilizar la intuición con base a la experiencia y analizar la incertidumbre que se genere, de acuerdo al caso y a la información epidemiológica existente de la enfermedad.

Un ejemplo de variación genética lo representan el complejo viral YHV-GAV-LOV, ya que los diferentes virus:

1. Causan los mismos daños histológicos.
2. Presentan replicación en el citoplasma de células de los tejidos infectados de camarones peneidos que incluye: órgano linfoide, branquias y hemocitos.
3. Presentan morfología similar y no son distinguibles por microscopía electrónica (principalmente GAV y YHV).
4. Se han detectado en la región Asia-Pacífico en *P. monodon*.
5. LOV, solo se ha encontrado en órgano linfoide.

### Comparaciones entre GAV y LOV

Las comparaciones entre GAV y YHV han demostrado que GAV presenta mayor similitud con los coronavirus, en base a la secuencia de su genoma. Los estudios realizados en tres regiones del gen de la ARN replicasa (ORF1b), para evaluar la relación genética entre GAV y YHV mostraron que estos dos virus varían en un 17.6% de la secuencia de nucleótidos y en un 10.7% en la secuencia de aminoácidos. La comparación fue entre 1,780 nucleótidos (6.0% del genoma total). Este grado

de variación es típico entre virus de ARN cercanos que pueden representar diferentes topotipos geográficos.

Se espera que las diferencias entre GAV y YHV sean mayores cuando se analicen otras regiones no tan conservadas como la de la enzima.

La comparación de secuencias amplificadas del gen ORF1b de aislados de LOV indicaron que existe una variación promedio de 1.5% con la secuencia nucleotídica del prototipo de GAV. Este valor se encuentra dentro del rango de variación observado dentro de una misma población de virus de ARN.

Lo anterior y otras características indican que GAV y LOV son variantes patogénicas y no patogénicas del mismo virus.

El trabajo realizado por algunos investigadores (Walker y Cowley., 1999), ha permitido contar con un método de RTP-PCR para detectar y diferenciar GAV y LOV. Los primers utilizados permiten distinguir ambas variantes y el mismo sistema amplifica un fragmento de YHV de un aislado viral de Tailandia.

La alta prevalencia de LOV en organismos silvestres de *P. monodon*, en el norte de Queensland, sugiere que las variantes patogénicas emergen de infecciones no patogénicas.

Existe otro sistema de RTP-PCR para la detección de YHV desarrollado por Wongteerasupaya *et al.*, 1997. Con el que se obtienen resultados diferentes al sistema anterior: no permite detectar GAV o LOV, debido a diferencias importantes en la secuencia de uno de los sitios de reconocimiento del primer.

### Comparación de las secuencias en el sitio de reconocimiento de los primers 10F y 144R para la detección de YHV y GAV

#### Primer 10F para:

YHV 5'- CCGCTAATTTCAAAAATAAG-3'  
GAV ATGATAACTTCAAGAATAATG  
Homología = 71.4%

#### Primer 144R para:

YHV 5'- CTTCTCGACATAACACCTT-3'  
GAV TCATCTTGATCTCAGCCCT  
Homología = 50%

Una evaluación de lo anterior sugiere que el sistema RTP-PCR para GAV, es específico para el grupo y permite la detección de los tres virus, mientras que el segundo sistema (YHV-PCR) discrimina entre ellos.

Lo anterior ilustra la necesidad de que los primers que se diseñen para diagnóstico por PCR, estén basados en un estudio del genoma viral y comparado con otras secuencias reportadas. Así mismo, se reconoce la necesidad de la estandarización y validación de procedimientos.

### Implicaciones en epidemiología

Los análisis de las secuencias de nucleótidos y otras técnicas moleculares, utilizadas para el análisis de aislados virales, son herramientas que tienen un gran potencial para trazar el origen y movimiento de los virus en una región.

También es posible discriminar entre cepas patógenas y no patógenas.

El ejemplo del complejo YHV presentado es aplicable para otros virus de ARN y puede ser aplicado a virus de ADN que infectan organismos acuáticos.

A través de la aplicación de PCR, de moderna tecnología de secuenciación y el desarrollo de sistemas bioinformáticos, la capacidad para acumular y analizar datos de nucleótidos es ahora una realidad.

Si se cuenta con procedimientos analíticos estándar y con protocolos de seguridad apropiados existe un gran potencial para utilizarlos como una poderosa herramienta en el manejo de la enfermedad y en definir bases más racionales para el control del movimiento de patógenos de animales acuáticos.

**Basado en:** Peter J. Walker y Jeff A. Cowley., 1999. CSIRO - Australia.

### TERCERA REUNIÓN DE TRABAJO SOBRE SANIDAD ACUÍCOLA PARA EL SECTOR PRODUCTIVO TRUCHA, CELEBRADA EN MORELIA, MICHOACÁN

*Martha Rodríguez Gutiérrez, Araceli Cortés García y Denise Contreras García*

Por la importancia que ha tenido la acuicultura en nuestro país y la inquietud de incrementar la productividad acuícola los Comités Estatales en Sanidad Acuícola han desarrollado reuniones de trabajo uniendo fuerzas con las diferentes instancias que tienen relación en este ámbito, así, convocaron a la tercera reunión de trabajo sobre Sanidad Acuícola para el Sector Productivo Trucha, celebrada en Morelia Michoacán los días 27 y 28 de Abril del 2006, donde participaron representantes del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA); de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA); la Coordinación del Programa Nacional de Sanidad Acuícola (PRONALSA); del Instituto Nacional de la Pesca (INP); integrantes de los Comités Estatales de Sanidad Acuícola de Chihuahua, Estado de México, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Puebla y Veracruz; de las Subdelegaciones de Pesca de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) de Chihuahua, Estado de México, Puebla, Michoacán, Jalisco y Zacatecas; de los Gobiernos de los Estados de México, Hidalgo y Michoacán; de Instituciones de docencia e investigación como la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH); la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad - Xochimilco (UAM-X.) y del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, de la Universidad Autónoma del Estado de México (CIESA-UAEM), así como truticultores de los estados participantes (Figura 1).



**Figura 1.** Representantes de los Comités Estatales de Sanidad Acuícola

En este sentido, con base en la problemática sanitaria que afecta al sector productivo trucha, se revisaron los acuerdos de la Segunda Reunión de Trabajo celebrada en Puebla en noviembre de 2005, referente a los temas de marco legal, importación, movilización y diagnóstico, los resultados que cada uno presentó fueron avances claves para ir solucionando la problemática que se enfrenta estableciendo algunas alternativas para su resolución. Así mismo se dió continuidad de las líneas de acción que a todos les interesaban (Figura 2 y 3).

Entre otros se destacan algunos de los acuerdo de los diferentes temas analizados en la reunión que se deberán realizar para continuar avanzando:

- 1) Enviar para revisión de las autoridades, instituciones de diagnóstico e investigación y Comités, la NOM010-PESC-1993, la NOM-011-PESC-1993 y el anteproyecto de NOM para Salmónidos y posteriormente convocar una reunión para integrar un grupo de trabajo.
- 2) Identificar las enfermedades exóticas para México y definir los mecanismos para su detección.
- 3) Impartir cursos de sanidad acuícola para la identificación, prevención, control y epidemiología de las enfermedades de la trucha.
- 4) Capacitar con expertos en la materia, a los técnicos de laboratorio sobre diagnóstico para la estandarización de pruebas.
- 5) Homologar criterios para diseñar materiales de difusión sencillos (folletos y otros).
- 6) Presentar avances sobre estandarización de los procedimientos de diagnóstico entre laboratorios.
- 7) Homologar los precios de los análisis y los tiempos de entrega de resultados de los diagnósticos.
- 8) Diseñar un instrumento o convenio de coordinación entre las partes, para el seguimiento de las importaciones.

- 9) Subir información a las páginas Web de los Comités, sobre los importadores y productores que estén libres de enfermedades.
- 10) Identificar, recomendar e informar sobre las granjas libres de enfermedades en la página de Internet, a los Comités y productores.
- 11) Emitir comunicado para informar a la Dirección General de Inspección y Vigilancia de la CONAPESCA al respecto.
- 12) Dar seguimiento al acuerdo de la Segunda Reunión de Trucha, relativo al acercamiento de los Comités de Sanidad Acuícola con los de Sanidad Vegetal, Salud Animal y Delegaciones Estatales de la SAGARPA, para apoyar el control de la movilización de animales, productos y subproductos.



**Figura 2.** Representantes de los participantes de Izquierda a derecha. Dra. Ana Berta Montero (INP), Biol. Luis Contreras (CONAPESCA), M.C. Francisco Arregui (CESAMICH), Ocean. Marco Ross (SENASICA), M.C. Catalina Rosas (Dir. Comisión Pesca Mich.) Biol. Sergio Arturo Cortés (Subdelegación de Pesca Michoacán) y MVZ. Arnoldo Molina Martínez (Subdelegado de Puebla).

Concluyendo con realizar la Cuarta Reunión de Trabajo sobre Sanidad Acuícola para el Sector Productivo Trucha, que se llevará al cabo en Hidalgo, en octubre de 2006, para dar seguimiento a las acciones que se definieron y continuar atendiendo la problemática identificada.



**Figura 3.** Investigadores de Izquierda a derecha Dra. Ana Berta Montero (INP) Dr. Gilberto Erosa (UACH); M. en C. Martha Rodríguez Coordinadora del PRONALSA (UAM-X.) y M. en C. Fernando Castillo (CIESA-UAEM)

### REUNIÓN DE LABORATORIOS QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO "ESTANDARIZACIÓN, ARMONIZACIÓN, INTERCALIBRACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN Y CONTROL DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN SALMÓNIDOS" EN LA UAM - X

*Martha Rodríguez Gutiérrez, Araceli Cortés García, Denise Contreras García y Hortencia Hernández Ruiz*

En las instalaciones del Laboratorio de Sanidad y Genética Acuícola, del Departamento el Hombre y su Ambiente, de la Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco el 14, 15 y 16 de Junio, se realizó el Segundo Taller SOBRE EL DESARROLLO DE MÉTODOS INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES DE PECES, como parte de las actividades del Proyecto: Estandarización, armonización, intercalibración de técnicas de diagnóstico para la detección y control de las principales enfermedades infecciosas en salmónidos, financiado por el CONACyT y la SAGARPA, con la participación del Instituto Nacional de la Pesca (INP), quién funge como coordinación general; el Centro Nacional de Salud Animal (CENASA); la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH); la Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco (UAM - X) y como invitada la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), para demostrar los avances que cada laboratorio tiene con relación al diagnóstico del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (VNPI) que afecta a salmónidos (Figura 1).



**Figura 1.** Curso-Taller sobre el desarrollo de Métodos Inmunológicos y Moleculares para el Diagnóstico de Enfermedades Virales

En este contexto, bajo la Coordinación de la Dra. Ana Berta Montero del INP, cada laboratorio presentó los avances con relación a las técnicas de ELISA y RT-PCR, para el diagnóstico de este virus.

En cuanto a la técnica de ELISA se hizo un ensayo con los laboratorios participantes, utilizando muestras que aportaron entre ellos, de cada una se tomaron original y réplica para

ser procesadas con el mismo kit. Los resultados obtenidos denotan que esta técnica y kit actualmente utilizados, son sensibles al diagnóstico del VNPI ya que los laboratorios obtuvieron los mismos resultados, independientemente del técnico que la realizó.



Figura 2. Realización de la prueba de ELISA para el Diagnóstico del VNPI

De igual manera en cuanto a la técnica de RT - PCR, la UACH y la UAM - X, mostraron los resultados con relación a la implementación de esta técnica, lo que facilitará la puesta en marcha por el resto de los laboratorios.

El compartir experiencias y evaluar resultados es uno de los objetivos del proyecto lo cual sin duda repercutirá en el mejoramiento de los servicios que cada laboratorio oferta a los productores de trucha arco iris, principal especie entre los salmónidos que se cultiva en México.

**COMITÉ EDITORIAL**  
**JUAN ANTONIO PÉREZ HERNÁNDEZ**  
 RESPONSABLE DEL DESPACHO DE LA DIRECCIÓN  
 DE ORGANIZACIÓN Y FOMENTO ACUÍCOLA  
 CONAPESCA-SAGARPA

**RESPONSABLES DE EDICIÓN**  
**MARtha RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ**  
 COORDINADORA DE LA RED DE  
 DIAGNÓSTICO  
 UAM—XOCHIMILCO  
**DENISE CONTRERAS GARCÍA**  
**ARACELI CORTÉS GARCÍA**  
**ANA KARINA RODRÍGUEZ VICENTE**

**CONTENIDO** **PÁGS.**  
**DIAGNÓSTICO DE ENFERMEADES INFECCIOSAS EN ORGANISMOS ACUÁTICOS, MAS QUE UNA TÉCNICA** 1  
*Jorge Cáceres Martínez 1,2, Rebeca Vásquez Yeomans 2, Adrián Mauricio García Ortega 2,3*  
 1,2 Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE. Laboratorio de Referencia de enfermedades de Moluscos PRONALSA-CICESE.  
 2 Instituto de Sanidad Acuicola, A.C.  
 3 Centro Regional de Estudios y Diagnóstico Fitosanitario del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California.

**IMPORTANCIA DEL MUESTREO Y ANÁLISIS INDIVIDUAL EN LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL BAGRE DE CANAL (CCVD)** 4  
*Gabriel Aguirre Guzmán y J. Genáro Sánchez Martínez*  
 Universidad Autónoma de Tamaulipas

**HALLAZGO DE *Bothriocephalus acheilognathi* EN CARPAS CULTIVADAS EN MÉXICO** 7  
*Feliciano Segovia Salina, Fernando Jiménez Guzmán, Ma. de la Paz Tijerina Garza, Aracely Alvarado Hernández*  
 Universidad Autónoma de Nuevo León

**VARIACIONES GENÉTICAS VIRALES Y SUS IMPLICACIONES EN LA DETECCIÓN DE VIRUS Y EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEADES VIRALES EN CAMARÓN** 9  
*Leobardo Montoya Rodríguez*  
 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad - Mazatlán

**TERCERA REUNIÓN DE TRABAJO SOBRE SANIDAD ACUÍCOLA PARA EL SECTOR PRODUCTIVO TRUCHA, CELEBRADA EN MORELIA, MICHOACÁN** 12  
*Martha Rodríguez Gutiérrez, Araceli Cortés García y Denise Contreras García*  
 Universidad Autónoma Metropolitana Unidad - Xochimilco

**REUNIÓN DE LABORATORIOS QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO "ESTANDARIZACIÓN, ARMONIZACIÓN, INTERCALIBRACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN Y CONTROL DE LAS PRINCIPALES ENFERMEADES INFECCIOSAS EN SALMÓNIDOS"** 13  
*Martha Rodríguez Gutiérrez, Araceli Cortés García, Denise Contreras García y Hortencia Hernández Ruiz*  
 Universidad Autónoma Metropolitana Unidad - Xochimilco

**DIRECTORIO**

**SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN (SAGARPA)**

LIC. FRANCISCO JAVIER MAYORGA CASTAÑEDA  
**SECRETARIO DE LA SAGARPA**

ING. RAMÓN CORRAL ÁVILA  
**COMISIONADO NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA**

BIOL. JUAN ANTONIO PÉREZ HERNÁNDEZ  
**ENCARGADO DEL DESPACHO DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ORGANIZACIÓN Y FOMENTO**

LIC. TONATIUH GRANADOS SAMANIEGO  
**DIRECTOR DE FOMENTO E INCENTIVOS A LA PRODUCCIÓN**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

DR. JOSÉ LEMA LABADIÉ  
**RECTOR GENERAL**

DR. CARLOS RICARDO SOLIS GONZÁLEZ  
**SECRETARIO GENERAL**

DR. CUAUHTEMOC V. PÉREZ LLANAS  
**RECTOR DE LA UNIDAD XOCHIMILCO**

LIC. HILDA RODSARIO DÁVILA IBAÑEZ  
**SECRETARIA DE LA UNIDAD XOCHIMILCO**

M. EN U. ROSA MARÍA NAJERA  
**DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

FIS. MARCO ANTONIO ZEPEDA  
**SECRETARIO ACADÉMICO**

M. EN C. MARTHA RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ  
**LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA ACUÍCOLA**

Esta edición constó de 1000 ejemplares y fue impreso en los talleres de la Dirección de Informática de Rectoría General de la UAM.

Consúltenos en: <http://www.xoc.uam.mx/pronalsa>

**DIRECTORIO DE INSTITUCIONES PARTICIPANTES EN LA RED DE DIAGNÓSTICO**

**Centro de Ciencias de Sinaloa (CCS)**  
 Dra. Martha Zarain Herzberg  
 Tel. 01(667)712 29 39  
 e-mail: martha@computo.ccs.net.mx

**Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)**  
 Dr. Jorge Hernández López  
 Tel. 01(622) 221 22 37 Ext.23  
 e-mail: jhlopez04@cibnor.mx

**Universidad de Occidente (UDO)**  
 Dra. Josefina Audelo del Valle  
 Tel. 01 (668) 816 10 00  
 e-mail: jaudelo@mochis.udo.mx

**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)**  
 M. en C. Leobardo Montoya  
 Tel. 01(669) 988 01 57  
 e-mail: montoya@victoria.ciad.mx

**Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)**  
 Dr. Jorge A. Cáceres Martínez  
 Tel. 01(646)174 50 50 ext. 244 44  
 e-mail: jcaceres@cicece.mx

**Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I. P. N Unidad Mérida (CINVESTAV)**  
 Dr. Víctor Manuel Vidal Martínez  
 Tel: 01(999) 98 12 960  
 e-mail: vvidal@km.cieamer.conacyt.mx

**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X)**  
 M. en C. Martha Rodríguez Gutiérrez  
 Tel. 01 (55) 54 83 74 94  
 e-mail: rogm0211@correo.xoc.uam.mx

**Universidad Autónoma de Nayarit (UAN)**  
 Dr. Norberto Vibanco Pérez  
 e-mail:nvibanco@nayarit.uan.mx  
 Tel: 01(311) 51 21 18 800

**Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)**  
 Centro Nacional de Sanidad Acuicola  
 Dr. Fernando Jiménez Guzmán  
 Tel/Fax. 01(818) 359 35 77  
 e-mail: toxicologiacuatica@hotmail.com

**Universidad de Sonora (USON)**  
 I. Q. León Armando Pérez Alvidrez  
 DICTUS. Tel. 01(662) 212 19 95  
 e-mail: lpezere@guayacan.uson.mx

**Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT)**  
 Dr. Gabriel Aguirre Guzmán  
 Tel. 01 (834)312 50 78  
 e-mail: gabaguirre@uat.edu.mx

**Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) CIESA**  
 M. V. Z. Fernando Vega Castillo  
 Tel. 01(722) 296 55 55  
 e-mail: mvzfv1@yahoo.com.mx

**Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON)**  
 Dr. José Cuauhtémoc Ibarra  
 Tel: 01(644) 410 09 00 Ext. 2100-04  
 e-mail: jibarra@itson.mx

**Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH)**  
 Dr. Gilberto Erosa de la Vega  
 Tel. 10 (614) 414 44 92  
 e-mail: gerosa@uach.mx

**NOTA:** Invitamos a nuestros lectores a enviarnos artículos sobre temas de interés de Sanidad Acuicola, así como sus sugerencias, acerca de este boletín a: Biol. Juan Antonio Pérez. Av. Camarón Sábalo s/n Esq. con tiburón, Col. Sábalo Country. C. P. 82100, Mazatlán, Sinaloa México. e-mail: jperzh@conapesca.sagarpa.gob.mx y/o M.C. Martha Rodríguez Gutiérrez. Laboratorio de Reproducción y Genética Acuicola. Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud. Del. Coyoacán, C. P. 04960, México D. F. e-mail: rogm0211@correo.xoc.uam.mx