

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y  
DESARROLLO, A. C.

PROCESAMIENTO DE IMÁGENES POLICROMÁTICAS COMO MÉTODO  
DE DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA  
(WSSV) EN CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)

Por

MARIA DEL ROSARIO PACHECO MARGES

---

Tesis aprobada por la

UNIDAD MAZATLÁN  
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

MAZATLÁN, SINALOA, MÉX.

FEBRERO DE 2004

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de esta tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del director de tesis.

---

Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar  
Director General del CIAD, A.C.

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de María del Rosario Pacheco Marges, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Manejo Ambiental.

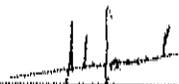


---

Dra. María Cristina Chávez Sánchez  
Director de Tesis

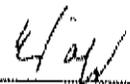
---

Dr. Josué Álvarez Borrego



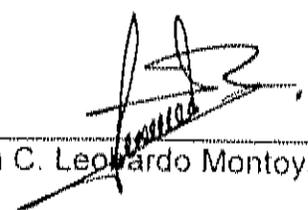
---

Dra. Silvia Alejandra García Gasca



---

Dra. Emma Josefina Fajer Ávila



---

M.en C. Leonardo Montoya Rodríguez

## AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por brindarme la beca que me permitió emprender este fascinante camino de la investigación.

Al CIAD por el apoyo económico otorgado, que me permitió concluir el presente trabajo de investigación.

A la Dra. María Cristina Chávez Sánchez por la dirección de esta tesis.

Al Dr. Josué Álvarez Borrego por su ayuda y dirección en la parte de procesamiento de imágenes.

A las siguientes personas, mi más profundo agradecimiento por ser parte de mi comité de tesis, por todo su apoyo en la parte de infección experimental, por todas las facilidades otorgadas en sus respectivos laboratorios en cuanto a material y equipo de laboratorio. Así como también, por sus aportaciones y sugerencias durante la revisión de este trabajo.

Dra. Silvia Alejandra García Gazca

Dra. Emma Josefina Fajer Ávila

M.en C. Leobardo Montoya Rodríguez

A la M.C. María Soledad Morales por su apoyo desinteresado durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A María del Socorro Sarabia por las innumerables veces que evitó con su ayuda y apoyo que cayera en la histeria. Muchas gracias Soquito.

No puedo dejar de agradecer a todo el personal que labora en el CIAD entre administrativos e investigadores, así como a todo el personal técnico que labora en servicios, por su apoyo desinteresado y su amable ayuda durante mis estudios de postgrado.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto de CONACyT "Procesado automático de partículas biogénicas" (clave 36075-B) a cargo del Dr. Josué Álvarez Borrego.

*Nadie puede revelarnos nada,  
excepto aquello que se encuentra dormido  
en lo profundo de nuestro conocimiento.*

*Kalil Gibran*

## DEDICATORIA

A mi Madre, a quien debo la vida y todo lo que soy. Por ser siempre mi guía, inspiración y fortaleza; por permitirme beber de su inagotable fuente de sabiduría (sentido común).

A mi Hermano, a quien amo profundamente y es el motor que me impulsa a continuar en el camino. Por hacerme sentir cada día de mi vida orgullosa de ser su hermana.

A mi Sobrino, quien ha venido ha despertamos a un mundo maravilloso de amor y que nos ilumina todos los días con su sonrisa. Porque ahora sé, que el retraso en la entrega de esta tesis se debe a él, porque quería ser parte de este humilde homenaje que hago a las personas que más amo y que sin su apoyo incondicional no habría terminado este trabajo de investigación.

A mi mamá Tere y mis primos Yuriria, Zirahuen y Cuahutémoc, por crecer conmigo, ser parte de lo que soy y darme momentos inolvidables que atesoro en mi corazón.

A mi amiga Anabel, por toda tu locura y gracias por estar ahí en los momentos más difíciles.

A mis amigas y compañeras de maestría. Porque los amigos son la respuesta a nuestros anhelos, gracias por tu sensatez Briscia, por tu autenticidad Joanna y tu alegría Roxana.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	XVII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	6
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo general.....	6
3.1.1. Objetivos específicos.....	6
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1. El virus de la mancha blanca (WSSV).....	8
4.1.1. Morfología y Morfogénesis del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).....	11
4.2. Métodos de Diagnóstico para la Detección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).....	12
4.2.1. Diagnóstico Clínico e Histopatológico.....	14
4.2.2. Técnicas moleculares utilizadas en el diagnóstico de WSSV.....	16
4.3. Infección Experimental.....	17
4.4. Estudios Epidemiológicos de WSSV.....	20
4.5. El Patrón de Difracción como Alternativa de Identificación del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).....	22
4.5.1. Sistemas Analizadores de Imágenes Aplicados a los Organismos del plancton.....	22

4.5.2.	Definición y Caracterización de los Patrones de Difracción.....	24
4.5.2.1.	La Teoría de la Difracción.....	24
4.5.3.	Procesado de Imágenes a través de Patrones de Difracción.....	27
4.5.4.	Reconocimiento de Partículas Biogénicas Utilizando el Patrón de Difracción.....	28
4.5.5.	Reconocimiento de Imágenes Policromáticas.....	31
4.6.	Validación de Técnicas de Diagnóstico.....	33
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5.1.	Sistema Experimental.....	35
5.2.	Medidas de Bioseguridad.....	36
5.3.	Infección Experimental.....	37
5.3.1.	Colecta de Organismos.....	37
5.3.2.	Preparación del Inóculo.....	38
5.4.	Bioensayos.....	39
5.4.1.	Infección por Inyección.....	39
5.4.2.	Infección <i>Per os</i> .....	41
5.5.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	43
5.5.1	Protocolo del kit IQ2000.....	43
5.5.2.	Protocolo del sistema WS1F/1R .....	43
5.6.	Histopatología.....	44
5.7.	Purificación y Marcaje de la Sonda de WSSV.....	45

5.8.	Hibridación <i>in situ</i> .....	47
5.9.	Procesamiento de Imágenes de los Cuerpos de Inclusión del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).....	47
5.9.1.	Reconocimiento de los cuerpos de inclusión del virus de la Mancha Blanca (WSSV) mediante correlación a color.....	47
5.10.	Determinación del porcentaje de reconocimiento de cuerpos de inclusión de WSSV, utilizando correlación a color.....	50
6.	RESULTADOS.....	51
6.1.	Infección Experimental.....	51
6.1.1.	Síntomas Externos de la Enfermedad.....	51
6.1.2.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	53
6.1.2.1.	Infección <i>Per os</i> .....	53
6.1.2.2.	Infección por Inyección Intramuscular.....	55
6.1.3.	Histología.....	59
6.2.	Hibridación <i>in situ</i> .....	62
6.3.	Reconocimiento de los Cuerpos de Inclusión de WSSV mediante correlación a Color.....	64
6.3.1.	Reconocimiento de los cuerpos de inclusión de WSSV por correlación a color.....	65
7.	DISCUSIÓN.....	73
7.1.	Infección Experimental.....	75

7.2.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	78
7.3.	Histología.....	79
7.4.	Hibridación <i>in situ</i> .....	80
7.5.	Reconocimientos de los cuerpos de inclusión (c.i.) de WSSV por correlación a color.....	81
8.	CONCLUSIONES.....	84
9.	LITERATURA CITADA.....	86
10.	APÉNDICES.....	107

## I. INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Factores interactivos (patógeno, hospedero y medioambiente) que determinan la enfermedad.....	8
<b>Figura 2.</b>	Si la luz se propaga en línea recta, sobre la pantalla CD la región AB queda iluminada.....	25
<b>Figura 3.</b>	La sombra que forma un borde no es completamente definida....	26
<b>Figura 4.</b>	La luz no se propaga en línea recta al pasar por el extremo de una rendija, sino que se "dobla", es decir se difracta. ....	27
<b>Figura 5.</b>	La figura muestra el modo de inyectar el inóculo en el tercer segmento abdominal de los camarones.....	40
<b>Figura 6.</b>	Visualización por electroforesis del fragmento a utilizar como sonda. ....	46
<b>Figura 7.</b>	Producto de PCR obtenido con el sistema WS1F1R. ....	46
<b>Figura 8.</b>	Diagrama de flujo de la metodología de correlación a color del virus del síndrome de mancha blanca (WSSV).....	49
<b>Figura 9.</b>	Juveniles de <i>L. vannamei</i> antes de ser inoculados con WSSV.....	51
<b>Figura 10.</b>	Juveniles de <i>L. vannamei</i> al segundo día post-infección.....	51

<b>Figura 11.</b>	Porcentaje de mortalidad acumulada de los dos bioensayos con juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a WSSV mediante administración oral ( <i>per os</i> ).....	52
<b>Figura 12.</b>	Porcentaje de mortalidad acumulativa de <i>L. vannamei</i> en los tres bioensayos de infección por inyección intramuscular con WSSV.....	53
<b>Figura 13.</b>	Patrones de amplificación de productos de PCR del experimento 1 de infección <i>per os</i> , utilizando el kit IQ2000 .....	54
<b>Figura 14.</b>	Patrones amplificación de productos de PCR del experimento 1 de infección <i>per os</i> , utilizando el sistema WS1F/1R.....	54
<b>Figura 15.</b>	Patrones de amplificación de productos de PCR del experimento 2 de infección <i>per os</i> , utilizando el kit IQ2000.....	55
<b>Figura 16.</b>	Patrones de amplificación de productos de PCR del experimento 2 de infección <i>per os</i> , utilizando el sistema WS1F/1R 1R .....	55
<b>Figura 17.</b>	Patrones de amplificación de productos de PCR del experimento 1 de infección por Inyección, utilizando el kit IQ2000.....	56

<b>Figura 18.</b>	Patrones de amplificación de productos de PCR del experimento 1 de infección por inyección, utilizando el sistema WS1F/1R 1R .....	56
<b>Figura 19.</b>	Patrones de amplificación de productos de PCR del experimento 2 de infección por inyección, utilizando el kit IQ2000.....	57
<b>Figura 20.</b>	Patrones de amplificación de productos de PCR del experimento 2 de infección por inyección, utilizando el sistema WS1F/1R 1R .....	57
<b>Figura 21.</b>	Patrones de amplificación de productos de PCR del experimento 3 de infección por inyección, utilizando el kit IQ2000.....	58
<b>Figura 22.</b>	Patrones de amplificación de productos de PCR del experimento 3 de infección por inyección, utilizando el sistema WS1F/1R 1R .....	58
<b>Figura 23.</b>	Sección longitudinal de branquias de juvenil de <i>L. vannamei</i> , infectado experimentalmente con WSSV.....	59
<b>Figura 24.</b>	Anormalidades histológica en una sección de juvenil de <i>L. vannamei</i> , infectado experimentalmente con WSSV.....	60

<b>Figura 25.</b>	Lesiones características de WSSV en una sección de juvenil de <i>L. vannamei</i> infectado.....	61
<b>Figura 26.</b>	Corte longitudinal de epitelio cuticular de juvenil de <i>L. vannamei</i> infectado con WSSV.....	61
<b>Figura 27.</b>	Corte longitudinal de epitelio cuticular de juvenil de <i>L. vannamei</i> infectado con WSSV.....	62
<b>Figura 28.</b>	Sección longitudinal de branquias de juvenil de <i>L. vannamei</i> infectado con WSSV.....	63
<b>Figura 29.</b>	Corte longitudinal de epitelio cuticular de juvenil de <i>L. vannamei</i> no infectado con WSSV.....	63
<b>Figura 30.</b>	Imágenes de cuerpos de inclusión de WSSV en una sección de glándula antenal.....	67
<b>Figura 31.</b>	Imágenes de cuerpos de inclusión de WSSV en una sección de tejido conectivo y en glándula antenal.....	68
<b>Figura 32.</b>	Imágenes de cuerpos de inclusión con WSSV en una sección de tejido epitelial y en glándula antenal. ....	69

**Figura 33.** Imágenes de cuerpos de inclusión con WSSV en  
una sección del órganos linfoide  
y en tejido hematopoyético. ....70

## ii. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Principales métodos de diagnóstico utilizados en camarones peneidos del Indopacífico y este de Asia (Modificada de Lightner y Readman, 1998).....	13
<b>Tabla 2.</b> Resultados de cuerpos de inclusión presentes en láminas histológicas.....	70
<b>Tabla 3.</b> Intervalos de confianza de los porcentajes de reconocimiento.....	72
<b>Tabla 4.</b> Preparación de mezcla maestra del Kit IQ2000, para la primera y segunda reacción de PCR.....	109
<b>Tabla 5.</b> Condiciones del termociclador (ThermoHybaid, SPRT001 ISSUE2, UK).....	110
<b>Tabla 6.</b> Preparación de mezcla maestra para el sistema WS1F/1R.....	111
<b>Tabla 7.</b> Condiciones del termociclador (ThermoHybaid, SPRT001 ISSUE2, UK).....	112
<b>Tabla 8.</b> Preparación de la mezcla maestra para la obtención de la banda del plásmido de WSSV.....	115

## RESUMEN

La introducción de especies exóticas de organismos acuáticos de una región a otra en el mundo, son la causa fundamental de la dispersión de organismos patógenos, muchos de los cuales han ocasionado pérdidas catastróficas para la actividad acuícola. El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), ha ocasionado pérdidas económicas y en consecuencia un impacto social muy importante en varias regiones del mundo. Para la identificación del patógeno, se utilizan diferentes técnicas de diagnóstico las cuales son complementarias para lograr un diagnóstico confiable de la enfermedad. La histología es una de las técnicas para diagnóstico de enfermedades más utilizada, debido a que con ella es posible observar los cambios patológicos a nivel celular. Sin embargo, como en la acuicultura se trata de poblaciones de organismos bajo cultivo, el diagnóstico de enfermedades implica la revisión de numerosos animales y en el caso de la histología, la observación de numerosas laminillas lleva un tiempo considerable (que depende del número de organismos a analizar). Por otro lado, los resultados pueden verse afectados por sesgos debido al cansancio y otros factores fisiológicos que afectan al técnico que realiza el diagnóstico. Para tratar de resolver este problema, se llevó a cabo este estudio para establecer la utilidad de los sistemas ópticos de procesamiento y reconocimiento de imágenes utilizando correlación a color con filtros de fase.

El reconocimiento de un cuerpo de inclusión (c.i.) viral en una lámina histológica es una tarea compleja, sobre todo si se considera que puede presentar diferentes morfologías durante el desarrollo de la infección, como es el caso del virus WSS. Esto, aunado a los cambios en las tonalidades de basofilia y acidofilia, que pueden depender también de la madurez de los colorantes. La correlación óptica a color puede resolver este problema, al

incrementar la capacidad de los filtros para el reconocimiento de patrones de difracción.

Para lograr lo anterior, la base de datos con que se alimentó el sistema se elaboró en base a las variantes morfológicas y de coloración que presentaron los c.i. de WSSV. Para ello se revisaron 300 láminas histológicas y se hicieron 5 clasificaciones. Los valores de sensibilidad y especificidad que se obtuvieron con el programa de correlación a color fueron de 86% y 2.7% respectivamente.

En los tejidos donde se observó un mayor reconocimiento (100%) fue en tejido nervioso y glándulas del tegumento, mientras que en los tejidos donde el sistema presentó un menor reconocimiento fue en epitelio del estómago y en corazón (78.4 y 69% respectivamente).

Con el presente trabajo se concluye, que el sistema de reconocimiento de c.i. de WSSV utilizando correlación a color debe ser perfeccionado; probando nuevos algoritmos que disminuyan el ruido en las imágenes y que realcen los rasgos más característicos de las morfologías de los c.i. de WSSV. Así como también, poner especial atención en el procesamiento de las imágenes; el equipo de digitalización de las imágenes debe contar con un alto nivel de resolución y finalmente ser muy estrictos en la construcción de la base de datos; debido a las variantes morfológicas y de color que presentan los c.i. de WSSV.

## ABSTRAC

The introduction of exotic species of aquatic organisms from a region to another one in the world, is the fundamental cause of the dispersion of pathogenic organisms, many of which have inflicted catastrophic casualties for the aquatical activity. The virus of the syndrome of the white spot (WSSV), has inflicted economic casualties and consequently a very important social impact in several regions of the world. For the identification of the pathogen, different techniques from diagnosis are used which are complementary to obtain a reliable diagnosis of the disease. The histology is one of the techniques for diagnosis of diseases more used, because with her it is possible to observe the pathological changes cellular level. Nevertheless, as in the aquaculture it is populations of organisms under culture, the diagnosis of diseases implies the animal revision numerous and in the case of the histology, the numerous observation of slides has been a considerable time (that depends on the number of organisms to analyze). On the other hand, the results can be seen affected by slants due to the fatigue and other physiological factors that affect the technician who makes the diagnosis. In order to try to solve this problem, this study was carried out to establish the utility of the optical systems of processing and recognition of images being used correlation to color with phase filters.

The recognition of an inclusion body (c.i.) viral in a histological slide is a complex task, mainly if it is considered that it can present/display different morphologies during the development from the infection, as is the case of virus WSS. This, combined to the changes in the tonalities of basofilia and acidofilia, that can also depend on the maturity of the colorantes. The optical correlation to color can solve this problem, when increasing the capacity of the filters for the recognition of diffraction patterns.

In order to obtain the previous thing, the data base whereupon fed the system was elaborated on the basis of the morphologic variants and of coloration that presented/displayed c.i. of WSSV. For it 300 histological slide were reviewed and 5 classifications became. The values of sensitivity and specificity that were obtained with the program of correlation to color were of 86% and 2,7% respectively.

In weaves where it was observed a greater recognition (100%) was in nervous weave and glands of the tegument, whereas in weaves where the system presented/displayed a smaller recognition was in epitely of the stomach and heart (78,4 and 69% respectively).

With the present work one concludes, that the system of recognition of c.i. of WSSV using correlation to color must be perfected; proving new algorithms that diminish the noise in the images and that heighten the characteristics most characteristic of the morphologies of c.i. of WSSV. As well as, to put special attention in the processing of the images; the equipment of digitalization of the images must count on a high level of resolution and finally to be very strict in the construction of the data base; due to the morphologic variants and of color that present/display c.i. of WSSV.

## 1. INTRODUCCIÓN

El total de la producción de camarón a nivel mundial por pesca y acuicultura representa alrededor del 20 por ciento del comercio internacional. Las importaciones combinadas de la Unión Europea, Japón y los Estados Unidos (E.U.) aumentaron en 1999 hasta alcanzar las 950 000 toneladas (tons), frente a las 900 000 tons de 1998. Datos preliminares indican que en el 2000, los E.U. aumentaron sus importaciones cerca de 2,000 millones de dólares. El camarón representó 3,800 millones de dólares equivalente al 37% de sus importaciones de productos comestibles pesqueros (FAO, 2002). En México, la producción pesquera de camarón en el periodo 1990-2000 presentó volúmenes constantes de crecimiento con 95 mil tons para el 2000. Así mismo, el camarón es la única especie de acuicultura a nivel nacional con crecimientos importantes y sostenidos del 22.6%. El volumen de producción de camarón de cultivo para el año 2000 fue de 33,480 tons, valor que representa el 17.8% de la producción acuícola nacional (Bancomext, 2002).

A pesar del desarrollo de la camaronicultura en los últimos años, las enfermedades de tipo viral, han sido el principal factor limitante en la producción y comercio acuícola, afectando el desarrollo económico y social del sector en muchos países del mundo. Las pérdidas económicas atribuidas a brotes de enfermedades en regiones de Asia fueron estimadas en al menos \$ 1,400 millones de dólares en 1990 (ADB/NACA, 1991).

Las pérdidas económicas en China alcanzaron \$ 1,000 millones de dólares en 1993. Tailandia, es otro de los países asiáticos más impactado por enfermedades, cuyas pérdidas en 1996 se estimaron en un 40% de la producción total (70,000 tons) valuadas en más de \$ 500 millones de dólares debido al virus de cabeza amarilla y virus del síndrome de la mancha blanca (Alday-Sanz y Flegel, 1997).

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés), se detectó por primera vez en países Asiáticos en 1992 (Chen, 1995; Flegel *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1995; Inouye *et al.*, 1994, 1996; Kimura *et al.*, 1996), causando las mayores pérdidas económicas registradas para la actividad acuícola. En Norteamérica, se diagnosticó desde 1995 en camarones silvestres y de cultivo en los estados de Texas y Carolina del Sur en los Estados Unidos (Lightner *et al.*, 1997) y en México se detectó por primera vez a finales de 1999 en granjas ubicadas en el Noroeste del país (Lightner *et al.*, 2000) asociada con altas mortalidades. Varios factores han sido relacionados al aparente incremento de las enfermedades. Los factores medioambientales y la pobre calidad de agua resultado de la misma contaminación, producto de la descarga de efluentes y la transferencia de patógenos debido al movimiento irresponsable de organismos acuáticos, parecen ser la causa fundamental de tales epizootias.

Los programas de cuarentena y certificación de salud, forman parte de la primera línea de defensa contra los posibles efectos adversos resultado de la introducción o transferencia de especies exóticas de peces y crustáceos. Debido a lo anterior, organismos internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Internacional de Epizootias (OIE), han desarrollado guías técnicas de buen manejo para el movimiento responsable de organismos acuáticos. Para ello, es necesario el desarrollo de bases de datos que contengan información de las enfermedades presentes a nivel regional y en cada país. Así como también, el desarrollo de programas de vigilancia e investigación para la detección de nuevas enfermedades, niveles de prevalencia y distribución geográfica de patógenos específicos (FAO, 2001). Para llevar a cabo estos programas, se utilizan diferentes técnicas, las cuales son complementarias para lograr un diagnóstico confiable de las enfermedades.

Las técnicas más utilizadas actualmente para determinar la presencia/ausencia de virus en patología de camarones, debido a su alta especificidad y sensibilidad son las técnicas de biología molecular basadas en el análisis de ADN, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Hibridación *in situ*, Dot Blot (Lightner, 1996), así como las técnicas basadas en detección inmunológica utilizando anticuerpos monoclonales (Poulos *et al.*, 2001).

La histología es también otra de las técnicas para diagnóstico de enfermedades más utilizadas, debido a que sólo con esta técnica es posible observar los cambios patológicos a nivel celular. Sin embargo, para el análisis de las láminas histológicas, es necesario examinar cuidadosamente cada una de ellas bajo el microscopio y el tiempo que toma realizar un diagnóstico depende de la naturaleza de los tejidos, el patógeno a observar, el número de organismos a analizar y la experiencia del técnico que realice las observaciones. Por último, las muestras analizadas con esta metodología deben ser evaluadas por un técnico debidamente entrenado en histopatología.

La observación de laminillas consume mucho tiempo y puede verse afectada por sesgos debido al cansancio y otros factores fisiológicos que afectan al técnico, lo cual puede repercutir en la validez de los diagnósticos conforme el número de muestras se incrementa, como sucede en los programas de vigilancia (estatus de salud de los organismos), programas de monitoreo o seguimiento (prevalencia e incidencia de enfermedades) y en estudios epidemiológicos ya sea en poblaciones silvestres o en estanques de cultivo.

La utilización de métodos automatizados puede ser la respuesta a este problema. Si se logra hacer una lectura de las laminillas en forma automática, los investigadores serán relevados de la identificación de patógenos conocidos y esto redundará en una mayor eficiencia para esta tarea. En este sentido los

sistemas ópticos de reconocimiento empiezan a ser de interés para los biólogos, ya que permiten facilitar las observaciones sobre la presencia de un organismo patógeno.

Desde la introducción de las técnicas de filtraje por Vander Lugh (1964), los métodos de correlación óptica basados en la forma de los objetos se han venido utilizando con éxito en el reconocimiento de patrones de difracción. Se han desarrollado diversos tipos de filtros con el propósito de reconocer una variedad de objetos.

En biología, se pueden mencionar los trabajos con filtros armónicos circulares de Zavala-Hamz y Álvarez-Borrego (1997) para el reconocimiento de diferentes especies de copépodos y los de Pech-Pacheco y Álvarez-Borrego (1998) sobre filtros clásicos para especies fitoplanctónicas.

El reconocimiento de un cuerpo de inclusión viral es una tarea compleja, sobre todo si se considera que puede presentar diferentes morfologías durante el desarrollo de la infección. En el caso de WSSV, en la fase temprana de la infección los cuerpos de inclusión son eosinofílicos, rodeados de un halo claro y un anillo de cromatina, lo cual los hace muy parecido a los cuerpos de inclusión de IHHNV (Lightner *et al.*, 1983). Por otra parte, los cuerpos de inclusión maduros tienen una apariencia más basófila (Wang *et al.*, 1999). Además, los cambios en las tonalidades de basofilia y acidofilia pueden depender también de la madurez de los colorantes.

La correlación óptica a color puede resolver este problema, al incrementar la capacidad de los filtros para el reconocimiento de patrones de difracción. El análisis de la forma como del color específico sería la variante metodológica que dé la posibilidad de identificar el cuerpo de inclusión de WSSV con eficiencia.

El color y la forma del cuerpo de inclusión dependen de la longitud de onda con que es iluminada, esto quiere decir, que el color introduce información

adicional para la efectividad del reconocimiento. La descomposición de un objeto policromático en tres canales monocromáticos rojo, verde y azul (RGB) permite realizar un reconocimiento independiente en cada uno de ellos, la suma de estos resultados produce un alto nivel de certeza en la identificación del organismo.

Con la finalidad de contar con un método capaz de identificar en forma automatizada al cuerpo de inclusión de WSSV, se llevó a cabo un estudio para establecer la utilidad de los sistemas ópticos de procesamiento y reconocimiento de imágenes utilizando correlación a color con filtros de fase.

## 2. HIPÓTESIS

El empleo de la técnica de procesamiento de imágenes por correlación a color, permitirá identificar los cuerpos de inclusión del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y realizar un diagnóstico confiable de esta enfermedad.

## 3. OBJETIVOS.

### 3.1. Objetivo General.

Identificar los distintos estados de desarrollo de los cuerpos de inclusión del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) mediante un procesado digital de imágenes por correlación a color.

#### **3.1.1. Objetivos Específicos**

1. Detectar la presencia de WSSV por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
2. Identificar mediante la técnica de histología convencional los diferentes estadios y formas de los cuerpos de inclusión del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV).

3. Comprobar que los cuerpos de inclusión hallados corresponden a WSSV mediante hibridación *in situ*.
4. Desarrollar una base de datos con imágenes de las diferentes morfologías y tonos de color de los cuerpos de inclusión y utilizar filtros compuestos en el proceso de correlación a color para realizar un diagnóstico confiable de la enfermedad de WSSV.
5. Establecer la confiabilidad en el proceso de correlación que identifique la morfología de los cuerpos de inclusión del virus WSS, mediante pruebas ciegas con IHNV (Virus de la Infección Hipodermal y Hematopoyética).

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. El Virus del Síndrome de la Mancha Blanca.

La industria del cultivo de camarón ha continuado su rápido crecimiento a pesar de las grandes pérdidas económicas ocasionadas por enfermedades que aparecieron casi desde el inicio de esta actividad. Las enfermedades incluyen etiologías infecciosas y no infecciosas. Entre las enfermedades infecciosas de importancia para éste cultivo se encuentran principalmente las de etiología bacterial, fungal, y viral (Lightner *et al.*, 1988, 1993, 1996; Brock and Lightner 1990). Las enfermedades son el resultado de una compleja interacción entre hospederos, medioambiente y patógenos. El Dr. S. F. Snieszko (1973) pionero en la patología acuícola ilustra este concepto utilizando tres círculos interrelacionados (Fig. 1).

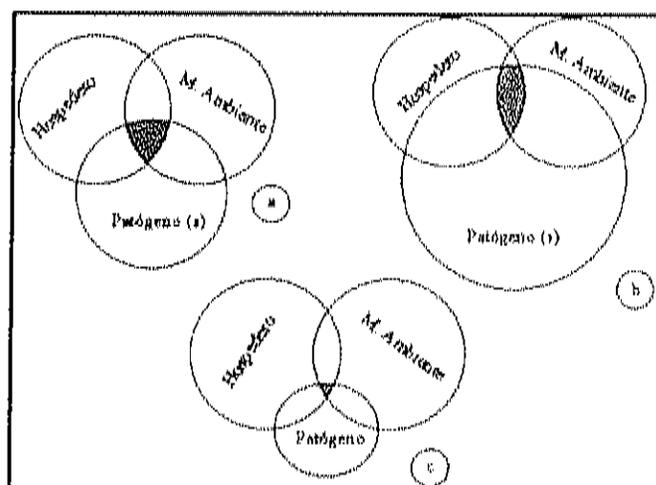


Figura 1.- Factores interactivos (patógeno, hospedero y medioambiente) que determinan la enfermedad. La incidencia o severidad de la enfermedad es indicada por el área sombreada en la intersección de las esferas. a) ilustra un estado de equilibrio entre patógeno, hospedero y medio ambiente; b) se observa un patógeno altamente virulento, mientras que c) muestra un patógeno poco virulento (figura modificada de Lightner y Readman, 1998).

De acuerdo al esquema, el resultado de la interacción entre el hospedero, patógeno y medioambiente puede variar de acuerdo a los cambios en la relación de cada uno o de todos los integrantes; esto es, el hospedero puede variar en especie, edad, estadio de vida, estatus nutricional, etc., el patógeno puede variar en virulencia, cantidad, mecanismos para evitar las defensas del hospedero, etc., y el medio ambiente puede variar de condiciones ideales a condiciones que favorecen más al agente causal de la enfermedad disminuyendo la capacidad de respuesta inmune. Esto no quiere decir que la presencia de un patógeno necesariamente dispare la enfermedad (Lightner and Readman, 1998). Bajo condiciones de infecciones persistentes, algunos patógenos han coevolucionado por millones de años con sus hospederos naturales reduciendo su virulencia y provocando poco o ningún efecto adverso en el hospedero (Weiss, 2002).

Los términos enfermedad y síndrome en patología humana y veterinaria tienen varias definiciones. De acuerdo al diccionario médico Dorland, se define enfermedad como: a) "un determinado proceso mórbido, seguido de una serie de síntomas característicos" o bien, b) enfermedad puede ser cualquier alteración normal del estado de salud del organismo, dando como resultado condiciones de pobre crecimiento o reducción de resistencia al estrés. Mientras que síndrome es definido como: a) "un conjunto de síntomas resultado de una sola causa que se observan comúnmente juntos para constituir una entidad clínica distintiva" o bien b) síndrome es referido generalmente a enfermedades que pueden ser acompañadas por pérdidas catastróficas (Lightner y Readman, 1998) tanto a nivel biológico (mortalidades masivas) como económico.

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) fue diagnosticado por primera vez en China y Japón en 1992 (Takahashi *et al.*, 1994) en cultivos de camarón, inicialmente pareció estar limitado al continente asiático. Sin embargo, por movimientos irresponsables de organismos acuáticos de una región a otra

del mundo, se diagnosticó más tarde en América, en Texas y Carolina del Sur en EU., en el mes de Noviembre de 1995 (Rosenberry, 1996). A principios de 1999, fue reportado en centro y Sudamérica y actualmente también ha sido detectado en Europa (Rosenberry, 2000).

Los signos clínicos de campo reportados para la infección de WSSV son mortalidades rápidas y masivas, generalmente en juveniles, pero puede afectar también a camarones adultos. Los camarones enfermos muestran manchas blancas acompañadas de coloración rojiza en todo el cuerpo (Kanchanaphum *et al.*, 1998). Se han reportado mortalidades asociadas a WSSV en varias especies de camarones peneidos cultivados (Takahashi *et al.*, 1994, Chou *et al.*, 1995, Durand *et al.*, 1996, Lo *et al.*, 1996, Wongteerasapaya *et al.*, 1996). Así como también, el virus ha sido detectado en un amplio rango de crustáceos silvestres, incluyendo cangrejos, langostas y camarones (peneidos y no peneidos) (Lo *et al.*, 1996, Maeda *et al.*, 1997).

El virus de la mancha blanca ha sido descrito con varios nombres; virus en forma de bastón de *Penaeus japonicus* (RVPJ) (Takahashi *et al.*, 1994), virus de la necrosis baculoviral hipodérmica y hematopoyética (HHNBV) (Huang *et al.*, 1995), baculovirus sistémico ectodérmico y mesodérmico (SEMBV) (Wongteerasapaya *et al.*, 1995; Sahul Hameed *et al.*, 1998), y baculovirus asociado al virus de mancha blanca (WSBV) (Wang *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 1996). Aunque ha sido reportada en varias localidades geográficas, los signos clínicos de la enfermedad son similares histológica, y morfológicamente, así como en estructura genómica (Flegel, 1997). Por lo tanto, se consideró que es el mismo virus o diferentes cepas del mismo y se clasificó como baculovirus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Nunan *et al.*, 1997). Posteriormente, WSSV fue asignado a la subfamilia Nudibaculoviridae a la cual pertenecen los baculovirus no ocluidos de la familia Baculoviridae (Francki *et al.*, 1991). Sin embargo, en subsecuentes reportes de la International Commission for Taxonomy

of Viruses (ICTV) se canceló esta clasificación y el virus se dejó sin asignar (Murphy *et al.*, 1995). Finalmente, posterior a los estudios recientes del genoma del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), se propuso una nueva familia para este virus; Nimaviridae (van Hulten *et al.*, 2000a).

#### **4.1.1. Morfología y Morfogénesis del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).**

Los viriones de WSSV presentan forma ovoide a bacilariforme con un apéndice en forma de flagelo en la parte terminal. Estos viriones constan de una nucleocápsida envuelta por proteínas unidas distintivamente en capas dando una apariencia rayada a la cápsida. Las nucleocápsidas aisladas miden de 65 a 70 nm de diámetro y 300 a 350 nm de longitud (Durand *et al.*, 1997; Nadala *et al.*, 1997). La nucleocápsida contiene una molécula de doble cadena de ADN de configuración circular. El genoma de WSSV es en la actualidad el genoma viral más grande secuenciado completamente, contiene 293 kpb abarcando 184 ORF's, que en su mayoría permanecen sin asignar, ya que no se han encontrado homologías en las bases de datos públicas, excepto 5, los cuales codifican para proteínas estructurales del virión (van Hulten *et al.*, 2001). Las partículas virales de WSSV contienen al menos 5 proteínas principales, con tamaños estimados de 28 kilodalton (kDa) para VP28, 26 kDa (VP26), las cuales están asociadas a la envoltura de la partícula viral y 24 kDa (VP24), 19 kDa (VP19), y 15 kDa (VP15) integradas a la nucleocápsida (van Hulten, *et al.*, 2000b). Existe evidencia que la proteína VP28 está directamente involucrada en la infección sistémica de *P. monodon* por WSSV (van Hulten *et al.*, 2001).

En análisis filogenéticos, se identificaron tres de los principales genes que codifican para proteínas estructurales del virión de WSSV y su traducción a proteína muestra que no existe ninguna relación con proteínas estructurales de baculovirus (van Hulten *et al.*, 2000 a, van Hulten *et al.*, 2000 b). Además, el

tamaño del ADN viral de alrededor de 300 kpb de WSSV se encuentra por encima del tamaño del genoma de los virus pertenecientes a la familia baculoviridae (100-180 kbp) (Hayakawa *et al.*, 2000).

Basada en toda la información reunida sobre la morfología, el genoma, estructura y análisis filogenéticos, se ha determinado que WSSV es miembro del género *Whispovirus* dentro de una nueva familia llamada Nimaviridae (Vlak *et al.*, 2002). Actualmente su ubicación taxonómica se encuentra registrada en el reporte del mes de Junio de 2002 de la ICTV.

#### 4.2. Métodos de Diagnóstico para la Detección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).

La patología de camarones, como apoyo para la industria del cultivo de camarón se inició hace más de 30 años. En los primeros trabajos sobre enfermedades de camarones se utilizaban métodos de diagnóstico relativamente simples como montajes húmedos de tejidos infectados para microscopio óptico y métodos microbiológicos clásicos. La histología de rutina y la microscopía de transmisión electrónica, fue incorporada como herramienta de diagnóstico para infecciones virales y microsporidios por patólogos de camarones peneidos en los años 70's (Baxter *et al.*, 1970, Couch, 1974), posteriormente se utilizaron para otras enfermedades incluyendo bacterias, hongos, y parásitos (Lightner, 1975; Brock and Lightner, 1990).

Actualmente los métodos de diagnóstico empleados por los patólogos de camarones, es una combinación entre los métodos clásicos de diagnóstico utilizados en la medicina humana y veterinaria (Tabla 1). Entre los más importantes y comúnmente utilizados se encuentran: observaciones clínicas, microscopía óptica directa, microbiología, histología de rutina y técnicas moleculares (Lightner and Readman, 1998).

Tabla 1.- Principales métodos de diagnóstico utilizados en camarones peneidos del Indopacífico y este de Asia (Modificada de Lightner y Readman, 1998).

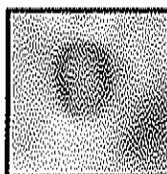
Métodos	Pruebas y datos obtenidos
Historia clínica	Historia de la enfermedad en las instalaciones o la región, diseño de instalaciones, fuentes de postlarvas (silvestre, domésticos específicos libres de patógenos, SPF, o resistentes, SPR), tipo de alimento usado, condiciones medioambientales, etc.
Signos clínicos	Lesiones visibles, comportamiento, crecimiento anormal, eficiencia de alimentación y conversión alimenticia, etc.
Microscopía directa	Campo iluminado, contraste de fase, exámenes microscópicos de tejidos teñidos en campo oscuro o frotis de tejidos sin teñir, montaje húmedo, montajes enteros, etc. De enfermedades o de especímenes anormales.
Histopatología	Histología de rutina o histoquímica (con tinciones especiales) análisis de secciones de tejidos.
Microscopio electrónico	Exámenes ultraestructurales de secciones de tejidos, preparación de tejidos negativamente teñidos, o muestras superficiales.
Cultivos e identificación bioquímicas	Cultivos de rutina y aislamiento de cepas bacterianas en medios artificiales e identificación usando reacciones bioquímicas en sustratos únicos.
Aumento o realce de infecciones	Crianza de muestras de camarones en estadios de vida apropiados bajo condiciones controladas, condiciones de estrés para aumentar la expresión de latencia o bajo grado de infección.
Bioensayo	Exposición de organismos susceptibles, camarones indicadores como presuntos portadores del patógeno.
Métodos serológicos	Uso de anticuerpos específicos como agentes de diagnóstico en inmunoblot, aglutinación, IFAT, ELISA u otras pruebas.
Hematología y química Clínica	Determinación de conteo de hemocitos diferenciales, tiempo de coagulación de la hemolinfa, glucosa, ácido láctico, ácidos grasos, ciertas enzimas, etc.
Toxicología/análisis	Detección de tóxicos por análisis y verificación de toxicidad por bioensayos.
Sondas de ADN	Detección de porciones únicas de ácido nucleico de un patógeno usando una sonda de ADN marcada.
PCR	Amplificación de secciones únicas del genoma de un patógeno para en seguida detectar concentraciones usando un par de oligos específicos.
Cultivos de tejidos	Cultivo in vitro de patógenos de camarón en sistemas de cultivo de tejidos que no son de camarón o en cultivo de células primarias derivadas de camarón.

#### 4.2.1. Diagnóstico Clínico e Histopatológico.

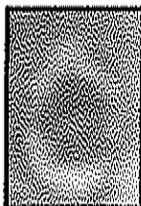
Existen numerosos trabajos sobre el diagnóstico clínico e histológico del síndrome del virus de la mancha blanca en camarones peneidos. Los signos clínicos reportados para la infección de WSSV son manchas o puntos blancos en la parte interior del cefalotórax y en el quinto-sexto segmento abdominal, a medida que se desarrolla la enfermedad se encuentran en todo el cuerpo, algunas veces las manchas están acompañadas de coloración rojiza. El tamaño de las manchas varía de un punto poco visible a manchas de 0.5 a 3.0 mm de diámetro. Otros signos de la enfermedad incluyen reducción en el consumo de alimento, pérdida de la cutícula, y tasas altas de mortalidad del 70 al 100% dentro de la primera semana posterior a la aparición de los signos clínicos (Kasornchandra *et al.*, 1998, Sudha *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1999). Se han reportado mortalidades asociadas a WSSV en varias especies de camarones peneidos cultivados (Karunasagar *et al.*, 1997, Chou *et al.*, 1998, Supamattaya *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1999, Rajan *et al.*, 2000). Así como también, ha sido detectada en un amplio rango de crustáceos silvestres, incluyendo cangrejos, langostinos, y camarones (peneidos y no peneidos) (Wang *et al.*, 1997, Supamattaya *et al.*, 1998, Sahul Hameed *et al.*, 2000, Chang *et al.*, 2001).

Las investigaciones realizadas en camarones infectados con WSSV, coinciden en los cambios histopatológicos observados. Estos cambios están caracterizados por una amplia degeneración celular, severa hipertrofia nuclear y presencia de cuerpos de inclusión en tejidos principalmente de origen ectodérmico y mesodérmico, especialmente en pleópodos, branquias, epidermis cuticular, epitelio del intestino posterior (incluyendo el estómago), tejido conectivo, tejido hematopoyético, tejido nervioso, órgano linfoide, glándula antenal, músculo estriado, corazón, hemocitos y gónadas (Lo *et al.*, 1997; Kasornchandra *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

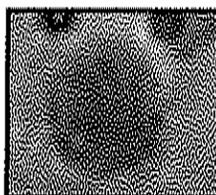
Los cuerpos de inclusión durante el desarrollo de la infección muestran 4 fases características (Wang *et al.*, 1999):



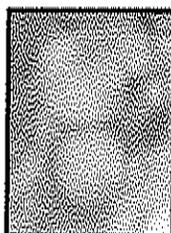
Fase 1: Núcleo levemente hipertrofiado, marginación de la cromatina y transformación de la región central en un área eosinofílica.



Fase 2: Núcleo más redondo, la cromatina marginal se incrusta en una capa menos densa formándose un anillo oscuro junto a la membrana nuclear. Se presenta una zona transparente entre este anillo oscuro y el estroma virogénico, formándose un cuerpo de inclusión Cowdry tipo A.



Fase 3: No se encuentra el anillo oscuro, se rompe la membrana nuclear y la zona transparente se fusiona con el citoplasma, los cuerpos de inclusión son basófilos.



Fase 4: El núcleo o toda la célula se desintegra observándose espacios vacíos en secciones de tejidos.

#### 4.2.2. Técnicas moleculares utilizadas en el diagnóstico de WSSV.

En la patología de camarones penaeidos, se han desarrollado técnicas moleculares para el diagnóstico de WSSV en condiciones asintomáticas, ya que la infección puede estar presente sin presentarse los signos gruesos de la enfermedad. Es el caso de varias especies de cangrejos y otras especies de crustáceos que son portadores de WSSV y que pueden transmitir la enfermedad a camarones de cultivo (Kanchanaphum *et al.*, 1998; Supamattaya *et al.*, 1998). Por otro lado, existe evidencia que WSSV infecta tejido reproductivo, por lo tanto existe transmisión maternal (Lo *et al.*, 1997); es decir las postlarvas pueden presentar el virus del síndrome de la mancha blanca de manera latente, por lo que son consideradas como la principal ruta de entrada en los estanques de cultivo (Flegel y Alday-Sanz, 1998). Debido a lo anteriormente expuesto, ha sido necesario el desarrollo de técnicas de diagnóstico sensibles como son la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Lo *et al.*, 1996a; Kimura *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1996) e hibridación *in situ*; (Durand *et al.*, 1996; Nunan *et al.*, 1997). Otra técnica de diagnóstico que ha sido desarrollada recientemente para la detección de WSSV, es la aplicación de anticuerpos monoclonales (Poulos *et al.*, 2001).

Dentro de los trabajos de diagnóstico del virus WSS utilizando la técnica de PCR, se encuentra el realizado por Kim *et al.* (1998), quien desarrolló la técnica para el diagnóstico del virus de la mancha blanca en *P. japonicus*, a partir de la secuencia de datos de ADN genómico de WSSV, se diseñaron oligos, con los cuales después de 30 ciclos de amplificación el sistema de la PCR fue capaz de detectar 1 pg de ADN del virus.

Por otro lado, Kasornchandra *et al.* (1998) diseñaron oligos a partir de un fragmento de una secuencia específica de ADN, a partir de una cepa de WSSV originaria de Tailandia y la comparó con otras cepas colectadas en varios países. Los resultados mostraron que las cepas estaban relacionadas y que eran el agente causal del síndrome de la mancha blanca, presente en 6 países de Asia.

Entre las técnicas moleculares utilizadas con éxito en la acuicultura de crustáceos, la de mayor especificidad y con la que se obtiene un diagnóstico definitivo es hibridación *in situ*. Como ejemplo, se tiene el trabajo realizado por Chang, *et al.* (1996), quien identificó el WSSV en diferentes órganos de *P. monodon*. Los resultados mostraron que es posible detectar el virus de la mancha blanca 16 hr post-infección en epitelio estomacal, branquias y epidermis cuticular. También, Lo *et al.* (1997), mostraron por medio de ésta técnica, que WSSV está presente en ovocitos, en células foliculares y en células del tejido conectivo de ovarios de hembras reproductoras de *P. monodon*.

#### 4.3. Infección Experimental.

Otro método comúnmente utilizado dentro de la investigación de enfermedades en organismos acuáticos, son las pruebas de infección experimental. Estos estudios pueden ser diseñados para analizar la patogenicidad, la virulencia y la mortalidad ocasionada por un agente infeccioso. Los organismos expuestos a una infección, pueden ser observados en su comportamiento en muestreos en diferentes intervalos de tiempo (Overstreet *et al.*, 1988).

Los primeros bioensayos de infección experimental en camarones fueron los realizados por Couch (1974a) quien alimentó con tejido hepatopancreático altamente infectado con *Baculovirus penaei* (BP) a 5 juveniles silvestres de *P. duorarum*. Cuatro de los cinco especímenes del estudio murieron después de 20 días, todos tenían núcleos hipertrofiados, pero ninguno presentaba cuerpos de inclusión. Mas tarde, este mismo autor en 1978 reportó las primeras infecciones de BP en un laboratorio de producción de postlarvas de camarón.

Existen varios trabajos de infección experimental con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Entre ellos se encuentran los realizados por Supamattaya *et al.* (1998) quienes estudiaron el efecto que podría tener la infección experimental en tres especies de crustáceos que residen comúnmente en granjas camaroneras y el efecto que podría causar esta infección. Para ello, utilizó tres rutas de infección (inyección, ingestión e inmersión), usando como inóculo tejido infectado de *P. monodon*. Basándose en los resultados del estudio, las especies de crustáceos probados, pueden ser consideradas como reservorios virales, ya que son capaces de portar la infección y puede persistir la infección por periodos significativos de tiempo, en el medioambiente de una granja de cultivo de camarón.

Así mismo, Kanchanaphum *et al.* (1998) utilizaron tres especies de cangrejos sospechosos de ser portadores de WSSV y que se encuentran comúnmente en granjas camaronícolas. La transmisión de la enfermedad a *P. monodon*, fue a través de la cohabitación de cangrejos y camarones en acuarios. Después de 24 horas de exposición, se detectó WSSV en camarones que cohabitaban con *Uca pugilator*, 36 horas después se detectó en camarones que cohabitaban con *Scylla serrata* y finalmente, después de 48 horas se detectó WSSV en camarones que cohabitaron con *Sesarma sp.*

Entre las rutas de infección experimental utilizadas, como ya se mencionaron, se encuentran: inyección, ingestión oral e inmersión. Chou, *et al.* (1998) realizaron pruebas de infección experimental con WSSV, por medio de la inmersión y la ingestión oral, suministrando tejido de *P. japonicus* o de *P. monodon*, como material infeccioso a juveniles sanos de *P. monodon*, *P. japonicus* y postlarvas de *P. penicillatus*. Las mortalidades acumulativas alcanzadas por las tres especies de camarón probadas, fueron del 100% dentro de los 4-6 días.

Mas tarde, Wang *et al.* (1999) probaron por ingestión oral, la virulencia de seis cepas de WSSV, en dos especies de camarones americanos (*Litopenaeus vannamei* y *Farfantepenaeus duorarum*). Las cepas utilizadas proventan de China, India, Tailandia, Texas, Carolina del Sur, y Washington. Durante las pruebas, el tejido infectado fue suministrado *per os* a postlarvas de *L. vannamei* y a juveniles de *F. duorarum*. Las mortalidades acumulativas alcanzadas por *L. vannamei* fueron del 100% con cada una de las cepas, siendo la de Texas y la de Washington la más y menos virulenta respectivamente. En caso contrario, los juveniles de *F. duorarum* alcanzaron solamente el 35-60% de mortalidades acumulativas.

Dentro de las pruebas de infección experimental, Soto *et al.* (2001) realizaron estudios de transmisión del WSSV a *L. vannamei*, comparando la infectividad relativa del cefalotórax, abdomen o cadáver entero de camarón infectado con mancha blanca, a partir de la estimación de la mortalidad y el coeficiente de transmisión, usando modelos epidemiológicos. Los resultados de las pruebas sugieren que no existen diferencias en la carga viral del cefalotórax y el abdomen infectados. Sin embargo, el cefalotórax fue más infeccioso, probablemente porque fue más apetecible para los organismos experimentales.

#### 4.4. Estudios Epidemiológicos de WSSV

Los métodos epidemiológicos son fundamentales para el entendimiento de las enfermedades infecciosas en la acuicultura. Cualquier sistema de producción acuícola, está integrado por individuos congregados en poblaciones y para los epidemiólogos, la población es la paciente. Asimismo, el propósito de la epidemiología es estudiar los patrones y causas de enfermedades en poblaciones y a través del análisis de estos patrones, comprender las causas de la enfermedad para lograr su control (Cameron, 2000).

Por otro lado, en la acuicultura, el manejo de la salud de organismos acuáticos se basa principalmente en medicar poblaciones; por lo tanto, las herramientas y métodos epidemiológicos son una elección natural para ubicar los problemas de enfermedades. Dentro de los métodos a los que se enfoca la epidemiología se encuentran los estudios de factores de riesgo, análisis de riesgo, evaluación de pruebas de diagnóstico, estudios experimentales y modelación de enfermedades infecciosas (Georgiadis *et al.*, 2001).

De acuerdo a las pruebas de infección experimental anteriormente descritas, el virus del síndrome de la mancha blanca ha sido considerado como altamente patogénico y catastrófico para la industria del cultivo de camarón, además de considerarse una seria amenaza para las pesquerías de camarones silvestres. Debido a ello, algunos investigadores se han dado a la tarea de emplear métodos epidemiológicos para su estudio. Como es el caso de Lotz y Soto (2002), quienes desarrollaron un modelo epidemiológico tipo Reed-Frost para WSSV en *L. vannamei*, con el fin de entender los factores que afectan la probabilidad de ocurrencia de esta enfermedad. El modelo incluye organismos susceptibles sin infectar, infectados en estado latente, infectados en estado agudo, y camarones infectados muertos. La fuente de nuevas infecciones en un brote de la enfermedad, se considera que puedan ser los organismos infectados

ya muertos. Finalmente, usando el modelo se pueden generar algunas hipótesis, acerca de los factores que podrían afectar el curso de una epidemia de WSSV en *L. vannamei*, que conducirían a estrategias de manejo exitosas.

Generalmente, los estudios epidemiológicos de enfermedades infecciosas de organismos acuáticos, son evaluados mediante pruebas experimentales. Los datos sobre la patogenicidad, características del agente infeccioso, así como la susceptibilidad y respuesta del hospedero, puede ser generadas por tales estudios. Todo esto, se realiza a nivel laboratorio bajo condiciones definidas y controladas. Sin embargo, la respuesta del organismo ante una enfermedad infecciosa, es diferente en campo y bajo condiciones de laboratorio. Por lo tanto, es imperativo que los resultados de laboratorio sean verificados y analizados en el campo (Georgiadis *et al.*, 2001).

Cuando se habla por ejemplo, de la estimación de la prevalencia de un agente patógeno, en una población en el medio natural, es importante obtener el mayor número de muestras analizadas con la presencia y características del patógeno, lo que resultará en una base más sólida para su identificación. Durante la tarea de revisar un gran número de muestras bajo el microscopio óptico, la calidad de la evaluación dependerá del técnico que realice las observaciones. A medida que el número de muestras aumenta, también aumenta el factor cansancio del técnico, disminuyendo la calidad de la identificación. Las variaciones de observación que tiene un técnico que revisa un gran número de muestras histológicas, se podrían eliminar si se considera la posibilidad de automatizar la identificación de agentes infecciosos conocidos como son los virus, a través de la utilización de sistemas ópticos de reconocimiento.

#### 4.5. El Patrón de Difracción como Alternativa de Identificación del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).

Los patrones de reconocimiento generados por un analizador de imágenes han tenido un uso común en la medicina y otras ciencias, con el fin de contar e identificar cualquier tipo de objeto. Watson (1952) diseñó un sistema para analizar partículas en el aire. El contador de leucocitos en la sangre fue diseñado por Preston (1962) teniendo subsecuentes modificaciones (Prewitt y Mendelsohn, 1966; Ingram y Preston, 1970). Pernick *et al.* (1978), realizaron un sistema de diferenciación de células cancerosas y células normales en el ser humano y por último, Pettipher y Rodríguez (1982) determinaron bacterias en la leche con una técnica similar a la anterior.

##### **4.5.1. Sistemas Analizadores de Imágenes Aplicados a los Organismos del Plancton.**

La clasificación e identificación de especímenes biológicos se ha llevado a cabo manualmente por ecólogos marinos y taxónomos expertos. La búsqueda de la automatización de esta tarea se ha estudiado por muchos años. Dichos estudios se han basado en el desarrollo de análisis de patrones, procesamiento de imágenes, análisis multiespectrales e inmunofluorescencia. Sin embargo, muchos de los sistemas sólo han logrado obtener resultados bajo condiciones de laboratorio con poblaciones cultivadas, pocos han tenido éxito cuando son aplicados en especímenes colectados en campo.

Se han realizados trabajos con sistemas analizadores de imágenes aplicados a organismos del plancton, como los descritos por Uhlmann y colaboradores en 1978, quienes utilizaron las mediciones de las formas de los organismos es decir el área, ancho, largo y proporción largo-ancho. Estos análisis se llevaron a cabo con cinco géneros de fitoplancton (*Asterionella*,

*Melosita*, *Fragilaria*, *Ceratium* y *Peridinium*). Furuya *et al.*, (1981, 1982) realizaron una estimación de los diferentes tamaños del fitoplancton por medio de un analizador de imágenes, las especies con las que trabajaron fueron: *Fibrocapsa japonica*, *Ptychodiscus brevis*, *Prorocentrum dentatum* y *Chaetoceros debile*. Tsuji y Nishikawa (1984) determinaron la especie de fitoplancton *Prorocentrum triestium* por medio de un analizador de imágenes fluorescentes.

Los sistemas analizadores de imágenes también se han utilizado para organismos del zooplancton. Jeffries *et al.* (1980,1984) trabajaron con un sistema analizador que fue capaz de discriminar las variables de largo, ancho y área de cada organismo. En este trabajo de analizaron ocho grupos taxonómicos de zooplancton. Rolke y Lenz (1984) realizaron estimaciones de zooplancton mediante un procesado de imágenes. Dietrich y Uhlig (1984) llevaron a cabo cuantificaciones de *Artemia salina* y diferentes estadios de copépodos por medio de mediciones de longitud, ancho, área y la relación ancho-longitud. Asano y Tanaka (1984) realizaron mediciones del tamaño de los huevos de peces con un método analizador de imágenes. Sieracki *et al.*, (1985) realizaron estimaciones de bacterioplancton por medio de un analizador de imágenes en microscopio de epifluorescencia. Chehdi y Boucher (1986) presentaron una serie de algoritmos para la cuantificación del zooplancton obtenidos con un procesador de imágenes. Bjornsen (1986) trabajó en un sistema analizador de imágenes para la cuantificación de bacterioplancton. Estep *et al.*, (1986) trabajaron en la estimación de organismos, desde bacterias hasta larvas de peces, por medio de una analizador de imágenes con una interfase computacional.

Otros trabajos orientados al análisis de imágenes del fitoplancton son los realizados por Gorsky y colaboradores en 1989, quienes realizaron un método en el cual se pueden estimar los organismos del fitoplancton mediante un

analizador de formas, los organismos que estimaron fueron *Prorocentrum micans*, *Nitzschia closterium* y *Hymenomonas elongata*. Brown *et al.* (1989) cuantificaron fitoplancton con un intervalo de tamaño de 1 a 2  $\mu\text{m}$  en monocultivos de especies como *Nannochloris bacillaris*, *Chysochromulina breviturrita* y *Euglena gracilis*, con un analizador de imágenes en base a sus formas dadas por el número de píxeles ocupados por la imagen. Simpson *et al.* (1992) realizaron un análisis de las especies fitoplanctónicas *Ceratium arcticum* y *C. longipes* por medio de la técnica de red neural; éste mismo método fue aplicado a la identificación de cianobacterias (Balfour *et al.*, 1992).

Los sistemas de redes neuronales y análisis multivariados, han sido utilizados recientemente para el reconocimiento de patrones de muestras biológicas. Estos métodos han sido empleados con imágenes pre-procesadas de dinoflagelados y tintínidos (la transformada de Fourier como una función de la forma del organismo) obteniendo más del 70% de clasificación correcta. Sin embargo, solo es posible observar la variación morfológica natural de las especies y es afectado por el detritus presente en las mismas muestras. Además, todavía presentan problemas en la escala y orientación de las imágenes (Simpson *et al.*, 1992; Culverhouse, *et al.*, 1994, 1996).

#### **4.5.1. Definición y Caracterización de los Patrones de Difracción.**

##### 4.5.1.1. La Teoría de la Difracción (Max Born and Emil Wolf, 1980).

La primera referencia al fenómeno de difracción aparece en trabajos de Leonardo Da Vinci (1452-1519). Sin embargo, tal fenómeno fue exactamente descrito por primera vez por Grimaldi en un libro publicado en 1665, quien observó fenómenos difractivos: al hacer pasar un haz de luz a través de una abertura practicada sobre una pantalla observó que, al proyectar el haz sobre

otra pantalla, el paso de la zona iluminada a la zona de sombra no era abrupto (como indica la propagación rectilínea).

Al trasladar las transmisiones del campo electromagnético general al campo de la óptica, el cual se caracteriza por longitudes de onda corta, se encuentra que en ciertas regiones el simple modelo geométrico de propagación de la luz es inadecuado. En particular, se observa que las desviaciones de luz de este modelo deben esperarse inmediatamente después del borde de las sombras y las regiones donde se encuentran un gran número de rayos. Estas desviaciones se manifiestan por la aparición de bandas de luz y oscuridad: conocidas como franjas de difracción. La teoría de la difracción concierne principalmente a estas regiones especiales; tales regiones son de un gran interés práctico, porque en ellas se incluye la parte del área de la imagen en la cual es situada la imagen óptica (región de enfoque). A continuación se describe con mayor detalle este fenómeno óptico.

Una experiencia muy común es que la luz se propaga en línea recta. Si se envía un haz de luz de una linterna sobre una pantalla, la región iluminada que se forma resulta de la propagación en línea recta de cada uno de los rayos del haz. Otro ejemplo es cuando se ilumina una rendija con un haz de luz (Fig. 2).

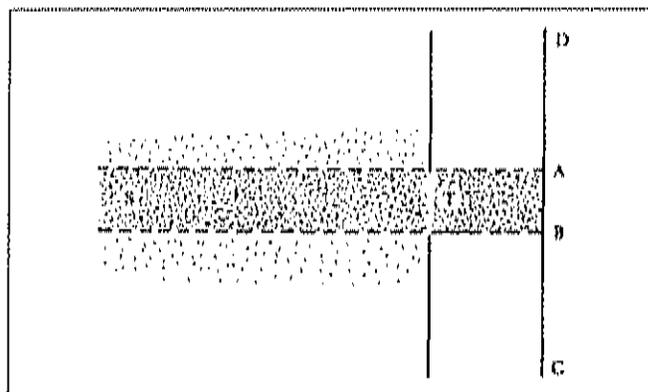


Figura 2. Si la luz se propaga en línea recta, sobre la pantalla CD la región AB queda iluminada.

Sobre la pantalla CD se forma una región iluminada AB, que resulta de la propagación rectilínea de los rayos del haz ST. Se forman así dos regiones de sombra: la BC y la AD. A pesar de estar muy acostumbrados a lo anterior, la realidad es un poco distinta. En efecto, si en el caso de la figura 2 se observa con detenimiento la frontera entre la región de sombra y la región iluminada, por ejemplo en A, se puede ver que no hay una separación bien definida entre las dos regiones; lo que se muestra en la figura 3. En esta figura, la flecha marca el lugar en que se encuentran la frontera A entre la región de sombra y la iluminada. Nótese que dentro de las regiones de sombra se forman regiones alteradas de zonas iluminadas y oscuras, que se van desvaneciendo gradualmente hasta que se entra francamente en la región de sombra.

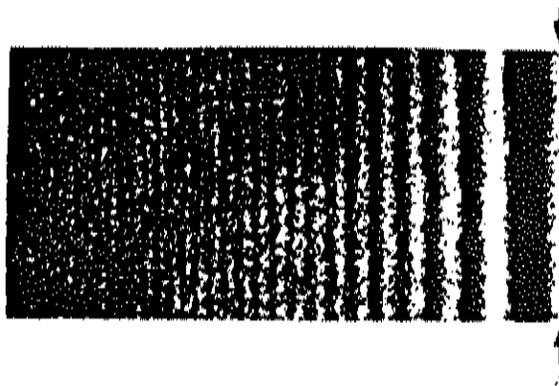


Figura 3. La sombra que forma un borde no es completamente definida.

La descripción hecha en el párrafo anterior indica que en realidad la luz no se propaga rigurosamente en línea recta, sino que al pasar por cada uno de los extremos H y K de la rendija (Fig. 4), en lugar de propagarse a lo largo de las líneas rectas HB y KA, la luz se "dobla" y llega a regiones BG y AF que deberían estar en la sombra.

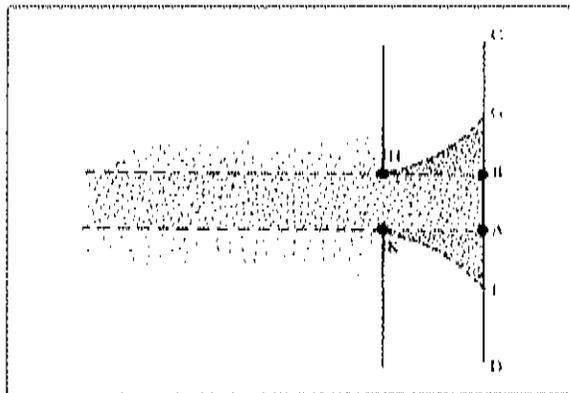


Figura 4. La luz no se propaga en línea recta al pasar por el extremo de una rendija, sino que se "dobla", es decir se difracta.

A este fenómeno en que la luz se "dobla" al pasar por el extremo de una superficie y no sigue su propagación en línea recta se le llama *difracción*.

#### 4.5.2. Procesado de Imágenes a través de Patrones de Difracción.

El uso de computadoras en el procesamiento de imágenes comenzó en los años 60's. Vander Lugt en 1964 introdujo el uso de técnicas óptico-coherentes para el reconocimiento de objetos utilizando filtros acoplados (*matched-filter*) o filtros "clásicos", a través de correlaciones matemáticas de la imagen de entrada y la imagen grabada en el filtro. Estos filtros son invariantes a posición gracias al patrón de difracción que coloca la información en el centro. Sin embargo, son sensibles a cambios a escala y rotación.

En los años setentas el grupo del Dr. Silverio Almeida utilizó por vez primera la transformada de Fourier en el procesamiento de imágenes de Diatomeas (Cairns 1972, Almeida 1972, 1976, 1978; Fuji y Almeida, 1979 a,b; Fuji *et al.*, 1980). Estos trabajos demostraron la utilidad de los patrones de difracción. Sin embargo, ninguno de estos estudios analizó en detalle los problemas que se encuentran durante los procesos de reconocimiento, tales como la invariancia en la localización de organismos dentro de la imagen, el

problema de ruido generado por cuerpos extraños a los organismos a identificar dentro de la imagen (detritus, partículas orgánicas, etc.) y las variaciones morfológicas de las especies, entre otros, los cuales de una manera u otra modifican la información de frecuencias que forman la imagen, generando identificaciones erróneas.

Dentro de las investigaciones con respecto al análisis de imágenes mediante sus patrones de difracción se tienen los trabajos de: Rodier y Rodier (1987) con análisis de interferogramas con base en patrones de difracción de imágenes; Negrete-Regagnon y Álvarez-Borrego (1990), que utilizaron el método para analizar imágenes de la superficie del mar; Farell (1992), aplicado a la descripción volumétrica de las partículas; Coordingluey (1993) y Leger y Morris (1993), dan una breve historia de la utilización y aplicación de la difracción, así como una perspectiva a la utilización de los patrones de difracción en el futuro para análisis de patrones de reconocimiento.

#### **4.5.3. Reconocimiento de Partículas Biogénicas Utilizando el Patrón de Difracción.**

Posteriormente, Zavala-Hamz, *et al.* (1996), utilizaron el patrón de difracción para el reconocimiento de tres especies de copépodos calanoides (*Acartia californiensis*, *A. tonsa*, y *Calanus pacificus*). Se realizó un análisis de conglomerado para las imágenes de los copépodos y para su patrón de difracción, para determinar cual grupo de imágenes discriminaba mejor entre género, especie y sexo. Los dendogramas de los patrones de difracción tuvieron más poder de discriminación y 50% menos variabilidad. Con este método se pudo discriminar a nivel género, especie y aún a nivel sexo. Más tarde Zavala-Hamz y Álvarez-Borrego en 1997 utilizaron filtros armónicos circulares los cuales hasta este momento solo se habían usado con propósitos militares. El reconocimiento de patrones invariantes a rotación usando filtros

armónicos circulares han sido ampliamente utilizados en la industria militar en las últimas dos décadas. Con este nuevo método también fue posible discriminar entre los géneros *Acartia* y *Calanus*.

Pech-Pacheco y Álvarez-Borrego (1998) utilizaron un sistema óptico-digital para el reconocimiento de cinco especies del fitoplancton del género *Ceratium*. El sistema fue altamente discriminatorio (>90%). Se produjeron picos de correlación solo cuando organismos de la misma especie se encontraban presentes en los filtros. Un año después, Pech-Pacheco *et al.*, (1999) cuantificaron e identificaron organismos responsables de las mareas rojas. En este trabajo identificaron seis especies del género *Ceratium* en base a su patrón de difracción. Posteriormente Pech-Pacheco *et al.* (2000) proponen un sistema automático con una estructura modular para la localización e identificación de diatomeas. Para el proceso de identificación se utilizaron técnicas basadas en la transformada de escala y técnicas de correlación cruzada a través de filtraje cepstral.

Por otro lado, Castro-Longoria *et al.* (2001) utilizaron un algoritmo basado en el módulo al cuadrado de la transformada rápida de Fourier (equivalente a la intensidad del patrón de difracción obtenido mediante un sistema óptico) para el reconocimiento de cinco especies de copépodos (*Calanus pacificus*, *Rhincalanus nasutus*, *Pleuromamma gracilis*, *Temora discaudata* y *Acartia tonsa*). Los patrones de difracción de estas especies fueron correlacionadas con filtros solo de fase invariantes a rotación y posición. Álvarez-Borrego *et al.* (2003) utilizaron la correlación invariante a escala, rotación y posición para discriminar entre cuatro especies de copépodos calanoides del género *Acartia*. Con esta metodología se pudo discriminar entre especies y aun a nivel de sexo. Mas tarde Castro-Longoria *et al.* (2003) utilizaron una metodología multidisciplinaria que involucra técnicas digitales, observaciones taxonómicas y técnicas moleculares para la identificación de tres especies crípticas de

copépodos harpacticoides (*Cletocamptus deitersi*). Los resultados mostraron un 93.3%, 86.6% y 77.86% de confiabilidad en el reconocimiento para cada una de las especies.

Pech-Pacheco *et al.* (2001a) utilizaron un sistema óptico-digital (invariante a rotación, posición y escala) para la identificación de especies de fitoplancton durante los florecimientos de mareas rojas, demostrando que es posible una identificación automatizada para este tipo de monitoreos. Posterior a este trabajo, Pech-Pacheco *et al.* (2001b) presentan una metodología automática que permite la localización e identificación de algunas especies fitoplanctónicas; específicamente diatomeas. Para ello, proponen la utilización de técnicas de autoenfoco y fusión. Con la realización de este trabajo se proporciona un sistema automático completo para el análisis de muestras fitoplanctónicas en microscopía de transmisión.

Las técnicas de procesamiento de imágenes usando correlación invariante también han sido utilizadas por Villalobos-Flores *et al.* (2001) quienes pudieron identificar 12 especies de diatomeas fósiles. Con esta metodología fue posible identificar las especies de diatomeas en base sólo a pequeños fragmentos de los organismos. Con esta misma metodología, Villalobos-Flores y colaboradores (2002), identificaron 21 especies de diatomeas fósiles. Este método de correlación es invariante a escala, rotación y posición de la imagen. Algunos resultados obtenidos mostraron que fue posible identificar ciertas especies de diatomeas con solo 2.12% de información de la imagen.

Uno de los trabajos mas recientes en el procesamiento de imágenes realizado por Pech-Pacheco *et al.* (2003) es la implementación de una nueva técnica para lograr la identificación de objetos, basados en la correlación invariante a escala, rotación y posición, utilizando la transformada a escala como una alternativa a las técnicas de Fourier-Mellin. Con este estudio

determinaron que el problema de reconocimiento de algunas imágenes es debido a la resolución de las mismas y no al algoritmo matemático utilizado en la identificación.

#### **4.5.4. Reconocimiento de Imágenes Policromáticas**

Muchas estrategias ópticas se han desarrollado en función exclusivamente de la forma del objeto a reconocer. Sin embargo, para enfrentar el problema de identificar objetos que difieren solo en la distribución del color, se diseñó la estrategia basada en la información de forma y color para el reconocimiento de imágenes policromáticas a través de un sistema multicanal que se basa en la descomposición tricromática RGB, filtros holográficos y correlación. Esta técnica se ha utilizado con éxito para el reconocimiento de diversos objetos, tales como caracteres, figuras geométricas (Yu y Chao, 1983, 1984; Bradiqué *et al.*, 1987; Millán *et al.*, 1989, 1992), pero no para organismos.

En los objetos policromáticos la forma depende de la longitud de onda de la iluminación. Por consecuencia, objetos con una distribución espacial del color diferente pueden parecer similares bajo una iluminación a cierta longitud de onda (Millán *et al.*, 1989, 1992). El proceso de reconocimiento multicanal para la identificación de objetos policromáticos está basado en la descomposición de la información de la forma y el color de las imágenes en tres canales monocromáticos donde el objetivo es identificado separadamente. Tres longitudes de onda  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$  que cubren el espectro de luz visible son seleccionadas para iluminar cada canal. Para cada uno se efectúa el procedimiento de reconocimiento con la técnica de filtraje y sus respectivos resultados se obtienen sucesivamente en un correlacionador 4F clásico. De esta manera se obtienen las tres correlaciones de la imagen de entrada con el filtro bajo diferentes longitudes de onda y la información de la distribución de

color de los objetos puede ser considerada (Ferreira *et al.*, 1992; Corbalan, 1993; Millán *et al.*, 1989, 1992).

Forero-Vargas *et al.* (2001) identificaron bacterias de tuberculosis, utilizando dos técnicas digitales: protocolos poco definidos (fuzzy rules) y correlación solo de fase. En este trabajo observaron que la forma de la bacteria no es suficiente como rasgo característico para su identificación, ya que muchas especies de bacterias presentan la misma forma. Por lo tanto utilizaron la información del color de la imagen de la bacteria. En el 2002, Forero-Vargas y colaboradores, utilizaron dos métodos para la segmentación de imágenes de tuberculosis, utilizando la información cromática y algoritmos de autoenfoco. Más tarde, Cristóbal-Pérez *et al.* (2003), presentaron una técnica de identificación automatizada para la tuberculosis. Esta técnica esta basada en la utilización del conocimiento heurístico, el cual es obtenido del contorno de la forma del bacilo, así como el uso de la información de color.

Álvarez-Borrego y Chávez-Sánchez (2001), utilizaron la correlación digital a color para la identificación del virus IHNV en tejidos de camarón. El reconocimiento de los cuerpos de inclusión se llevó a cabo descomponiendo la imagen del objeto a reconocer en tres canales monocromáticos (RGB) e identificando el objeto independientemente en cada canal. Los cuerpos de inclusión fueron detectados cuando simultáneamente se produjeron picos de correlación máxima en los tres canales. Sin embargo, en este trabajo no se consideró la correlación invariante a escala y rotación. Con este primer trabajo en tejidos de camarón se demuestra el potencial de la técnica de diagnóstico no solo para IHNV, sino que puede ser utilizado para la identificación de otros virus y patógenos.

Álvarez-Borrego *et al.* (2002), evaluaron la utilidad de los sistemas ópticos de correlación de imágenes a color, con invariancias a posición, rotación

y escala para el reconocimiento de *Vibrio cholerae* 01. Los resultados mostraron que es posible el reconocimiento de la bacteria a pesar de los cambios de tamaño, posición y rotación. Por otro lado, Fajer-Ávila y Álvarez-Borrego (2002) utilizaron la correlación invariante de los patrones de difracción de algunas especies de parásitos de peces (*Heterobothrium ecuadori*, *Neobenedenia melleni*, *Lintonium vibex*, *Homalometron longisinosum*, *Bianium plicatum* y *Phyllodistomum mirandai*). La información del color se convirtió en un factor muy importante para la discriminación entre las especies analizadas durante todo el proceso de identificación. El reconocimiento de las imágenes a color invariantes a escala, posición y rotación, se realizó a través de la transformada a Escala.

#### 4.6. Validación de Técnicas de Diagnóstico

Muchas enfermedades requieren para su medición, el uso de pruebas de diagnóstico para examinar presuntos organismos infectados. Ejemplo de estas pruebas de diagnóstico son: Pruebas bioquímicas, ELISA, histopatología y PCR, por mencionar algunas.

Ninguna prueba de laboratorio es perfecta, por lo que se detectan resultados incorrectos ocasionalmente. Cuando se utiliza una prueba de diagnóstico, es importante conocer con que exactitud y error trabaja. El funcionamiento de una prueba de diagnóstico se basa en su precisión (escaso error al azar, medido por la repetibilidad de la prueba) y validez (escaso error sistemático). La validez tiene dos mediciones; la sensibilidad y la especificidad. Estos términos tienen una definición especial en epidemiología. La sensibilidad de una prueba mide la proporción de animales enfermos que la prueba identifica correctamente como enfermos. La especificidad mide la proporción de animales no enfermos que la prueba identifica correctamente (Cameron, 2000).

La sensibilidad y especificidad son indicadores de la validez de pruebas de diagnóstico (Thrusfield, 1995). La estimación de la sensibilidad y la especificidad, exige hacer pruebas donde el estatus de salud es conocido, para ello se requiere el uso de un apropiado y claro método de diagnóstico como "gold estándar" (Fegan, 2000) como método de validación.

## 5. MATERIALES Y METODOS.

### 5.1. Sistema Experimental.

Los experimentos se realizaron en la sala de acuarios del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Mazatlán. Esta sala se utiliza exclusivamente para llevar a cabo experimentos de infección experimental con virus de camarón.

La sala cuenta con tres tanques de aclimatación de fibra de vidrio de 450 L (Rotoplas<sup>MR</sup>, México), dispuestos en una estructura de acero inoxidable con base de madera de 0.30 m de ancho por 3.0 m de largo. Los dos tanques de sedimentación de fibra de vidrio (Rotoplas<sup>MR</sup>, México) de 450 L utilizados en el sistema, se encuentran instalados sobre una estructura de hierro que mide 2.5 m de largo y 0.60 m de ancho.

Para los bioensayos, se utilizaron 10 acuarios de aproximadamente 30 L de capacidad y cada acuario dividido en 2 unidades experimentales por una pieza de vidrio de 3 mm de espesor. Los acuarios se encuentran colocados en una estructura de hierro que mide 2.5 m de largo y 0.30 m de ancho. Cada uno de los acuarios contó con aireación independiente a través de piedras difusoras de 1 pulgada de diámetro.

Cada bioensayo, se realizó bajo un sistema cerrado, los recambios fueron del 30% y se hacían diariamente por las mañanas. El agua marina utilizada durante cada uno de los experimentos se dejó sedimentar previamente, para posteriormente ser filtrada a través de cartuchos tipo cuno de 10 y 1  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Finalmente, el agua fue esterilizada con luz UV (Aquaplus UV-4SS $\lambda$  235 nm., Industrias Mass, México).

## 5.2. Medidas de Bioseguridad.

Para evitar una contaminación cruzada, en el transcurso de los bioensayos, cada uno de los acuarios contó individualmente con su propio material y equipo (redes, cubetas, línea de aire, y piedras aireadoras). El equipo de uso común, cada vez que se utilizó fue enjuagado con una solución de cloro al 2%. Otra medida de prevención fue separar físicamente los controles negativos de los acuarios con las réplicas de cada bioensayo (Hasson *et al.*, 1995). Además, cada uno de los acuarios contó con una tapa de acrílico, para evitar infecciones cruzadas por aerosoles.

Las medidas sanitarias incluyeron un adecuado lavado y desinfección de todo el material al iniciar y finalizar cada experimento. Para la desinfección se utilizó hipoclorito de sodio al 0.05%. Por último, el agua producto de los recambios, fue desinfectada por hipercloración por 24 horas (Lotz, 1997) antes de ser eliminada.

Se evitó el tránsito a la sala de bioensayos a personas ajenas al estudio. Así como también, se usó dentro de la sala un tapete sanitario con una solución permanente de cloro al 2%. Finalmente, los organismos muertos durante la etapa de investigación y que no fueron necesarios para el procesamiento histológico fueron incinerados.

### 5.3. Infección Experimental.

Por las características propias del trabajo de investigación, éste se dividió en dos etapas: Infección experimental y procesamiento de imágenes. En la primera, se llevó a cabo la obtención de material infectado con WSSV, en el cual por medio de histología se pudieron observar los cuerpos de inclusión del virus de mancha blanca. La obtención de este material se realizó de dos maneras; llevando a cabo una infección experimental y por otro lado haciendo uso del material que se cuenta en el acervo histopatológico del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán.

#### **5.3.1. Colecta de Organismos.**

Se trasladaron juveniles sanos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con un peso de  $1 \pm 0.27$  gramos, procedentes de una granja y se trasladaron a la Unidad Mazatlán en Acuacultura y Manejo Ambiental, CIAD, A.C. Previa a la colecta, se tomó una muestra de 25 camarones de un estanque seleccionado, para verificar por la técnica PCR que estuvieran libres de WSSV, utilizando el kit IQ2000 (Farming Intelligene Tech. Corp, USA).

El lote de aproximadamente 300 organismos fue transportado a la sala de acuarios de esta unidad de investigación, en bolsas de plástico con oxígeno y depositadas en cajas de poliuretano y mantenidas a una temperatura entre 20-23°C. Los organismos fueron aclimatados durante cinco días en dos tanques de plástico de 450 L (Rotoplas<sup>MR</sup>, México) mantenidos con aireación constante y alimentados *ad libitum* con alimento peletizado Camaronina (Purina<sup>MR</sup>, México) con un contenido de proteína del 30%. El alimento fue suministrado diariamente y distribuido en dos tiempos; a las 9:00 y a las 17:00 horas.

### 5.3.2. Preparación del Inóculo.

Durante la realización de los bioensayos de infección experimental, se llevaron a cabo dos tipos de infecciones: Inyección intramuscular y *Per os*.

Los organismos utilizados para la preparación del inóculo, se obtuvieron durante el mes de Septiembre del año 2001 de un brote de WSSV de una granja acuícola de la región, donde se cultiva camarón y que a la fecha de la realización de los experimentos, se había mantenido en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  (congelador Kelvinator, USA). Para confirmar que el tejido utilizado en la preparación del inóculo era positivo para WSSV, se corrió una reacción de PCR utilizando el kit comercial IQ2000.

Para los bioensayos de infección vía inyección intramuscular, se prepararon 2 tipos de inóculo. Para la obtención del primer inóculo, se hicieron algunas modificaciones a los trabajos de infección realizados por Hasson *et al.* (1995) y Overstreet *et al.* (1997). Se preparó un homogenizado que contenía el material infectado con WSSV en una proporción de 1:10 (w/v) de tejido y buffer TN (23.37 g de Cloruro de Sodio y 2.42 g de Tris base en 1 lt de agua destilada). Se utilizó un robot de cocina ( Moulinex ®, USA) para macerar 14.14 g de tejido en 30 ml de buffer TN para facilitar la homogenización. Con el resto del buffer se enjuagó el equipo y el homogenizado fue depositado en tubos de plástico graduados de 10 ml (Corning®, USA). Los tubos fueron centrifugados durante 3 minutos a 3000 rpm y a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga (Beckman, modelo GS-15R, USA) utilizando un rotor F1010. El producto sobrenadante de esta centrifugación fue transferido a tubos limpios y nuevamente se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido, se transfirió a tubos limpios y se centrifugaron por 3 minutos a 1200 rpm. Posteriormente este sobrenadante fue pasado a través de filtros de membrana estériles de  $0.8\ \mu\text{m}$

### 5.3.2. Preparación del Inóculo.

Durante la realización de los bioensayos de infección experimental, se llevaron a cabo dos tipos de infecciones: Inyección intramuscular y *Per os*.

Los organismos utilizados para la preparación del inóculo, se obtuvieron durante el mes de Septiembre del año 2001 de un brote de WSSV de una granja acuícola de la región, donde se cultiva camarón y que a la fecha de la realización de los experimentos, se había mantenido en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  (congelador Kelvinator, USA). Para confirmar que el tejido utilizado en la preparación del inóculo era positivo para WSSV, se corrió una reacción de PCR utilizando el kit comercial IQ2000.

Para los bioensayos de infección vía inyección intramuscular, se prepararon 2 tipos de inóculo. Para la obtención del primer inóculo, se hicieron algunas modificaciones a los trabajos de infección realizados por Hasson *et al.* (1995) y Overstreet *et al.* (1997). Se preparó un homogenizado que contenía el material infectado con WSSV en una proporción de 1:10 (w/v) de tejido y buffer TN (23.37 g de Cloruro de Sodio y 2.42 g de Tris base en 1 lt de agua destilada). Se utilizó un robot de cocina ( Moulinex ®, USA) para macerar 14.14 g de tejido en 30 ml de buffer TN para facilitar la homogenización. Con el resto del buffer se enjuagó el equipo y el homogenizado fue depositado en tubos de plástico graduados de 10 ml (Corning®, USA). Los tubos fueron centrifugados durante 3 minutos a 3000 rpm y a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga (Beckman, modelo GS-15R, USA) utilizando un rotor F1010. El producto sobrenadante de esta centrifugación fue transferido a tubos limpios y nuevamente se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido, se transfirió a tubos limpios y se centrifugaron por 3 minutos a 1200 rpm. Posteriormente este sobrenadante fue pasado a través de filtros de membrana estériles de  $0.8\ \mu\text{m}$

de poro (Acrodisc®, Gelman Sciences, USA). Finalmente, con el producto de esta filtración se prepararon alícuotas, las cuales fueron colocadas en tubos estériles de 1.5 ml y se mantuvieron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización.

En el segundo inóculo, la fuente de tejido infectado con WSSV fue obtenida de organismos positivos del Laboratorio de Servicios de esta Unidad, fechados en el mes de Septiembre del año 2002 y que a la fecha se encontraba en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El tejido fue homogenizado con buffer TN en una proporción de 1:5 (w/v). Para llevar a cabo el proceso de maceración del tejido, se utilizó una licuadora (Hamilton Beach®, modelo 58200, USA). Se colocaron 50 g de tejido infectado con WSSV en 50 ml de buffer TN para facilitar la homogenización, los 50 ml de buffer restantes se utilizaron para enjuagar el equipo. El homogenizado fue depositado en tubos de plástico graduados de 10 ml (Corning®, USA) y centrifugados a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 9 minutos a 10,000 rpm en una centrífuga (Beckman GS-15R, USA) utilizando un rotor F1010. El sobrenadante producto de esta centrifugación fue transferido a tubos limpios y nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm durante 9 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se tomó nuevamente el sobrenadante y con él se prepararon alícuotas, las cuales fueron colocadas en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml y se mantuvieron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización.

#### 5.4. Bioensayos.

##### **5.4.1. Infección por Inyección.**

En el primer bioensayo, se utilizaron 100 juveniles de camarón blanco con un peso de  $1.07 \pm 0.29$  g previamente aclimatados. El primer inóculo preparado se administró inyectando un volumen de  $20 \mu\text{l}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso corporal (Soto, *et al.*,

2001), para ello se utilizó una jeringa de insulina estéril de 1 cm<sup>3</sup> (Plastipak, Becton-Dickinson, México). Los camarones fueron inyectados en el tercer segmento abdominal (Fig. 5) y posteriormente, cada camarón fue colocado aleatoriamente en 6 unidades experimentales (3 acuarios), acondicionadas previamente con agua de mar filtrada y esterilizada con aireación constante. Se inyectaron 20 organismos con buffer TN siguiendo las mismas especificaciones utilizadas en los organismos inyectados con inóculo, para que sirvieran como control negativo.

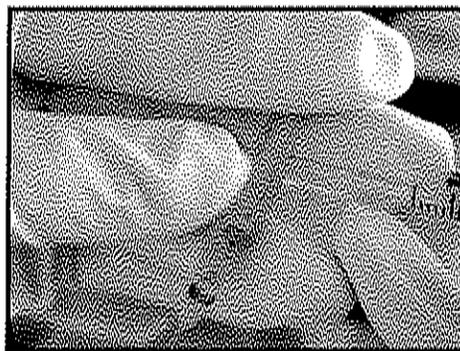


Figura 5.- Método de inyección del inóculo en el tercer segmento abdominal de los camarones.

En el segundo bioensayo se utilizó el mismo inóculo, inyectando 95 juveniles de camarón blanco provenientes del mismo lote de organismos que se utilizaron en el experimento anterior. El peso de estos juveniles fue de  $2.03 \pm 0.21$  g. El volumen de inóculo administrado fue de  $30 \mu\text{l}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso corporal. En seguida de la inoculación de los camarones, se siguieron las mismas especificaciones que para el experimento anterior.

Para el tercer experimento de infección vía inyección intramuscular, se utilizó el segundo inóculo preparado con una proporción de tejido infectado con WSSV y buffer TN de 1:5. En este bioensayo 50 juveniles con peso promedio de  $2.5 \pm 0.3$  g se inocularon con  $40 \mu\text{l}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso corporal. El inóculo se administró utilizando una jeringa de insulina estéril de 1 cm<sup>3</sup> (Plastipak, Becton-

Dickinson, México). Cada camarón fue inyectado en el último segmento abdominal y finalmente distribuidos aleatoriamente en 3 unidades experimentales. Los organismos del control negativo fueron inyectados con buffer TN siguiendo las mismas especificaciones que para el inóculo.

En el transcurso de los bioensayos, todos los organismos de las unidades de experimentación y controles negativos fueron alimentados *ad libitum* con alimento peletizado Camaronina (Purina<sup>MR</sup>, México) con un contenido de proteína del 30%. El alimento fue suministrado diariamente y distribuido en dos tiempos; a las 9:00 y a las 17:00 horas.

Se llevó un registro diario de los síntomas clínicos de cada una de las unidades experimentales. Los organismos muertos, encontrados en las unidades de experimentación, fueron retirados para evitar la alteración en la proporción de tejido infectado suministrado. Se colectaron muestras diariamente, utilizando una red para acuarios de 12 cm (Hagen, Malasia). A los organismos colectados, se les disectaron los pleópodos, los cuales fueron depositados en tubos estériles de 1.5 ml. Esto, con la finalidad de realizar análisis por PCR. El resto del cuerpo de cada uno de los organismos colectados fue colocado en frascos de plástico con tapa de rosca de 500 ml de capacidad. Todas las muestras fueron preservadas con fijador Davidson y etiquetadas con la fecha, el número de acuario y tipo de infección para su posterior procesamiento histológico.

#### **5.4.2. Infección *Per os*.**

El tejido infectado con WSSV para llevar a cabo los experimentos por ingestión, fue el mismo que se utilizó para la preparación del primer inóculo (proporción de tejido y buffer TN 1:10). El tejido fue macerado y homogenizado. Se prepararon porciones para cada unidad experimental correspondiente a un horario de

alimentación. Para el pesado de las porciones de alimento infectado con WSSV se utilizó una balanza analítica (Scientech SP30, USA). Las porciones fueron mantenidas en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  y descongeladas individualmente en cada horario de alimentación.

En el primer bioensayo se utilizaron 100 juveniles de camarón blanco con peso de  $1 \pm 0.25$  g. Los organismos permanecieron sin alimentar 24 horas antes de iniciar el experimento. El alimento fue suministrado en 2 tiempos a las 08:00 y a las 16:00 horas a razón del 10% del peso corporal/día (Wang, *et al.*, 1999) durante 3 días. Posteriormente y hasta finalizar el experimento se alimentó *ad libitum* con alimento peletizado Camaronina (Purina<sup>MR</sup>, México).

Se realizó un segundo bioensayo de infección por ingestión, en esta ocasión se utilizaron 20 juveniles de camarón blanco con peso de  $2.95 \pm 0.62$  gr. El alimento infectado con WSSV fue suministrado durante 5 días a razón del 10% del peso corporal/día (Wang, *et al.*, 1999). Todas las demás indicaciones se siguieron como en el bioensayo anterior.

En ambos bioensayos se llevó un registro diario de los síntomas clínicos y mortalidades de cada una de las unidades experimentales. Los organismos muertos fueron retirados para evitar el deterioro en la calidad de agua de los acuarios. De las muestras colectadas se disectaron los pleópodos a cada organismo y colocados en tubos estériles de 1.5 ml. Esto, con la finalidad de llevar a cabo análisis por PCR. El resto del cuerpo de cada uno de los organismos colectados fue preservado con fijador Davison para su posterior observación histológica. Los organismos del control negativo fueron colectados al finalizar el bioensayo y también fueron preservados para los análisis histológicos.

### 5.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Debido a que los diferentes sistemas de PCR que existen varían en cuanto a la especificidad y sensibilidad al diagnosticar virus en camarones, durante el desarrollo de esta investigación se utilizaron 2 sistemas; uno comercial y otro desarrollado en el Ciad Mazatlán:

- a) El kit comercial IQ2000 (Farming Intelligene Tech. Corp, USA).
- b) El sistema WS1F/1R (Montoya, datos no publicados)

Para desarrollar esta técnica de diagnóstico, fue necesario llevar a cabo previamente la extracción de ADN de los organismos recolectados durante la infección experimental. La extracción se realizó utilizando el buffer de lisis y siguiendo el protocolo y las recomendaciones del fabricante del kit IQ2000 (Apéndice A).

#### **5.5.1. Protocolo del kit IQ2000.**

Para desarrollar la técnica de la PCR bajo este protocolo, se siguió la técnica descrita por *Lo et al.*, (1996), así como las recomendaciones del fabricante del Kit (Apéndice B)

#### **5.5.2. Protocolo del sistema WS1F/1R .**

El sistema WS1F/1R es una reacción de un solo paso, los oligos amplifican un producto de 200 pb del ADN de WSSV. La secuencia de los oligos es la siguiente:

WS1F      5' CAC CAT GGA TAT TTC AAA TAA G 3'  
 WS1R      5' ACT TGC AGA GAA TAC GAA GC 3'

Los oligos fueron diseñados, a partir de una secuencia reportada en la base de datos del GenBank de acuerdo a Montoya *et al.* (en preparación). La síntesis y liofilización de éstos, fue realizada por el laboratorio BQ "The Providers". La reconstitución de dichos oligos, se llevó a cabo en las instalaciones del CIAD, A.C., Mazatlán, de la siguiente manera:

De acuerdo a la cantidad total inicial en microgramos de los oligos liofilizados, se hizo una dilución 1:1 (w/v) con agua bidestilada ( $1\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), seguida por una dilución 1:4 para obtener una concentración final de  $250\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $0.25\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ). La mezcla maestra se preparó como se muestra en el Apéndice C.

#### 5.6. Histopatología.

El procesamiento histológico se realizó siguiendo la metodología propuesta por Lightner (1996). Los organismos colectados fueron inyectados con solución Davidson en el hepatopáncreas y músculo con jeringas de insulina de  $1\text{ cm}^3$  (Plastipak, Becton-Dickinson, México). Así como también, fueron sumergidas en frascos con esta misma solución por un tiempo de 24 horas. Posteriormente se enjuagaron con agua corriente para eliminar el exceso de fijador y se añadió etanol al 70% por un tiempo mínimo de 24 horas. Posteriormente, los organismos fueron seccionados longitudinalmente intentando realizar el corte lo más limpiamente posible para evitar el desgarramiento de tejidos. Una sección fue conservada como referencia y la otra fue dividida en cefalotórax y abdomen, las secciones obtenidas fueron colocadas en casetes de plástico (Tissue-Tek unicasette, USA). A continuación, se llevó a cabo el proceso de deshidratación en un tren de deshidratación automática (Tissue-Tek II, Sakura Finetechnical Co. Japón). En seguida, se realizó la inclusión en parafina

(Histoembebedor Leica-Jung, USA). Los bloques obtenidos fueron descalcificados con una solución de ácidos orgánicos diluidos al 50% en agua destilada durante una hora. Posteriormente, se obtuvieron los cortes a un grosor de 5  $\mu\text{m}$  utilizando un microtomo manual (Jung Histocut-Leica®, USA). Se seleccionaron los cortes que tuvieran los tejidos más completos y se depositaron en el baño de flotación (Fisher 135 lighted, USA) para que los tejidos se extendieran y pudieran ser montados en los portaobjetos para su posterior tinción.

Se utilizó la técnica de tinción hematoxilina-eosin-floxina propuesta por Lightner (1996). Esta técnica de tinción involucra la hidratación de los tejidos en un tren de reactivos como se muestra en el apéndice D. Posterior a la tinción, las láminas fueron montadas en resina sintética diluida en xileno y cubiertas con cubreobjetos (Corning, USA 25 X 50 mm). Finalmente, fueron colocadas en el horno (Felisa, México) a 30°C durante 24 horas para su secado.

### 5.7. Purificación y Marcaje de la Sonda de WSSV.

Previo al desarrollo de la técnica de hibridación *in situ*, fue necesario llevar a cabo la purificación y marcaje de la sonda para la detección de WSSV. Para la purificación de la banda se utilizó el kit Promega, (USA) (Apéndice E). El marcaje de la sonda se llevó a cabo siguiendo la técnica de random priming, para ello se utilizó el kit de Roche No. 093657(USA) (Apéndice F).

Para la obtención de la sonda por PCR se utilizaron los siguientes oligos:

WS2F      5' GGC TGT ACA CAT GTC AGT GTT CT 3' (23 MER)  
WS2R      5' CCT ATC CTA CAA CTT CTG CAG CC 3' (23 MER)

La secuencia de nucleótidos de estos oligos de WSSV se obtuvo de la base de datos GenBank (N° de Acceso U92007) depositada por Kim y Jang (1997). Estos oligos amplifican un producto de 737 pb, el cual fue ligado al vector PGEM-T (Promega, USA) y clonado en el laboratorio de Biología Molecular en el CIAD Mazatlán. Dentro de este fragmento se encuentra la secuencia de 200 pb que es amplificada con el sistema WS1F1R, este fragmento fue utilizado como sonda (Fig. 6). Posterior a la purificación de la banda de 200 pb se corrió un gel para visualizar el producto (Fig. 7).

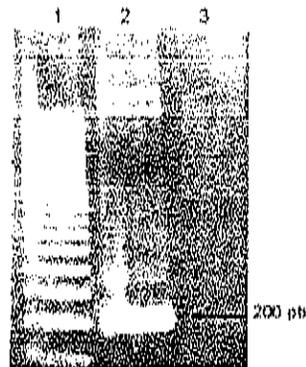


Figura 6.- Visualización por electroforesis del fragmento a utilizar como sonda. Línea 1.- Marcador de peso molecular (de 100 a 1000 pb); línea 2.- Producto de PCR del plásmido de WSSV y Línea 3.- control (-).

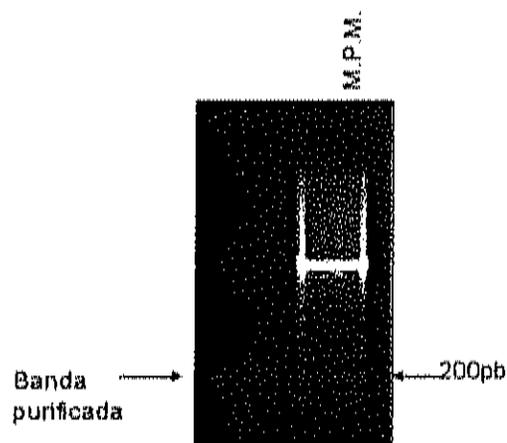


Figura 7.- Producto de PCR obtenido con el sistema WS1F1R. Se observa la banda purificada del plásmido de WSSV en la línea 1 y el marcador de peso molecular (de 100 a 1000 pb) en la línea 2.

### 5.8. Hibridación *in situ*.

Se obtuvieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de tejido infectado y fueron colocados en laminillas cargadas positivamente (Sigma, USA) posteriormente, se llevó a cabo la hibridación *in situ* de acuerdo a la técnica descrita en el manual Boehringer Mannheim (1996), y siguiendo las recomendaciones del fabricante del kit comercial (DiagXotics®, Inc., USA) (Apéndice G).

### 5.9. Procesamiento de Imágenes de los Cuerpos de Inclusión del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).

Por medio de una cámara digital (Cyber-Shot, DSC-S75, Sony, Japan.) conectada a un microscopio óptico (Carl Zeiss, axioskop 2 plus, Germany) y utilizando un objetivo de 63X se obtuvieron las imágenes de los cuerpos de inclusión del virus del síndrome de mancha blanca (WSSV), procedentes de tejidos de camarones infectados. Cada imagen,  $f(x,y)$ , fue grabada en formato bmp con el programa Pixel View. El tamaño para cada una de las imágenes fue de 256 X 256 píxeles.

#### **5.9.1. Reconocimiento de los cuerpos de inclusión del virus de (WSSV) mediante correlación a color.**

Se llevó a cabo una simulación numérica para correlacionar las imágenes tomadas de las láminas histológicas de diferentes tejidos y órganos de juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) que contienen los cuerpos de inclusión del síndrome del virus de mancha blanca. Para llevar a cabo esta correlación, se obtuvo un banco de 300 imágenes de las diferentes formas, tamaños y variaciones de color de los cuerpos de inclusión.

El procedimiento que se llevó a cabo para la correlación a color, se muestra en la figura 8.

En el paso 1, se tiene el banco de imágenes de las diferentes formas, tamaños y variaciones de color de los cuerpos de inclusión. Este banco de imágenes fue llamado banco de filtros. Para un mayor realce de la información que contienen los filtros, las imágenes  $f_1, f_2, \dots, f_n$ , se elevaron al cuadrado (paso 2).

En el paso 3, cada imagen fue descompuesta en los tres canales RGB (por sus siglas en inglés; rojo, verde y azul) los cuales cubren el espectro visible. Para cada canal se obtuvo la transformada de Fourier (paso 4) la cual da información del contenido de frecuencias que forma la imagen del filtro.

En el paso 5, se definió un filtro solo de fase haciendo que la magnitud de  $F$  ( $|F|$ ) sea igual a uno (Horne and Gianino, 1984). Las imágenes de las láminas histológicas que contienen los cuerpos de inclusión fueron llamadas imágenes problema (IP) (paso 6).

De la misma manera que el paso 2, la imagen problema fue elevada al cuadrado (paso 7). En el paso 8, cada IP fue descompuesta en tres canales (RGB). Para cada canal se obtuvo la transformada de Fourier (paso 9).

Se determinó el espectro cruzado en el paso 10, y en el paso 11 se obtuvo la correlación de la IP para el filtro  $i$ -ésimo, en cada canal RGB mediante la transformada inversa de Fourier.

En el paso 12 se muestra el resultado de la correlación a color multiplicando la correlación obtenida en cada canal. Para cada filtro  $i$ -ésimo se guardó el resultado obtenido en la correlación a color (paso 13).

Finalmente, cuando se correlacionaron las IP's con los  $n$  filtros (en este caso,  $n=100$ ). La correlación final es la suma de los resultados de las correlaciones para cada filtro (paso 14).

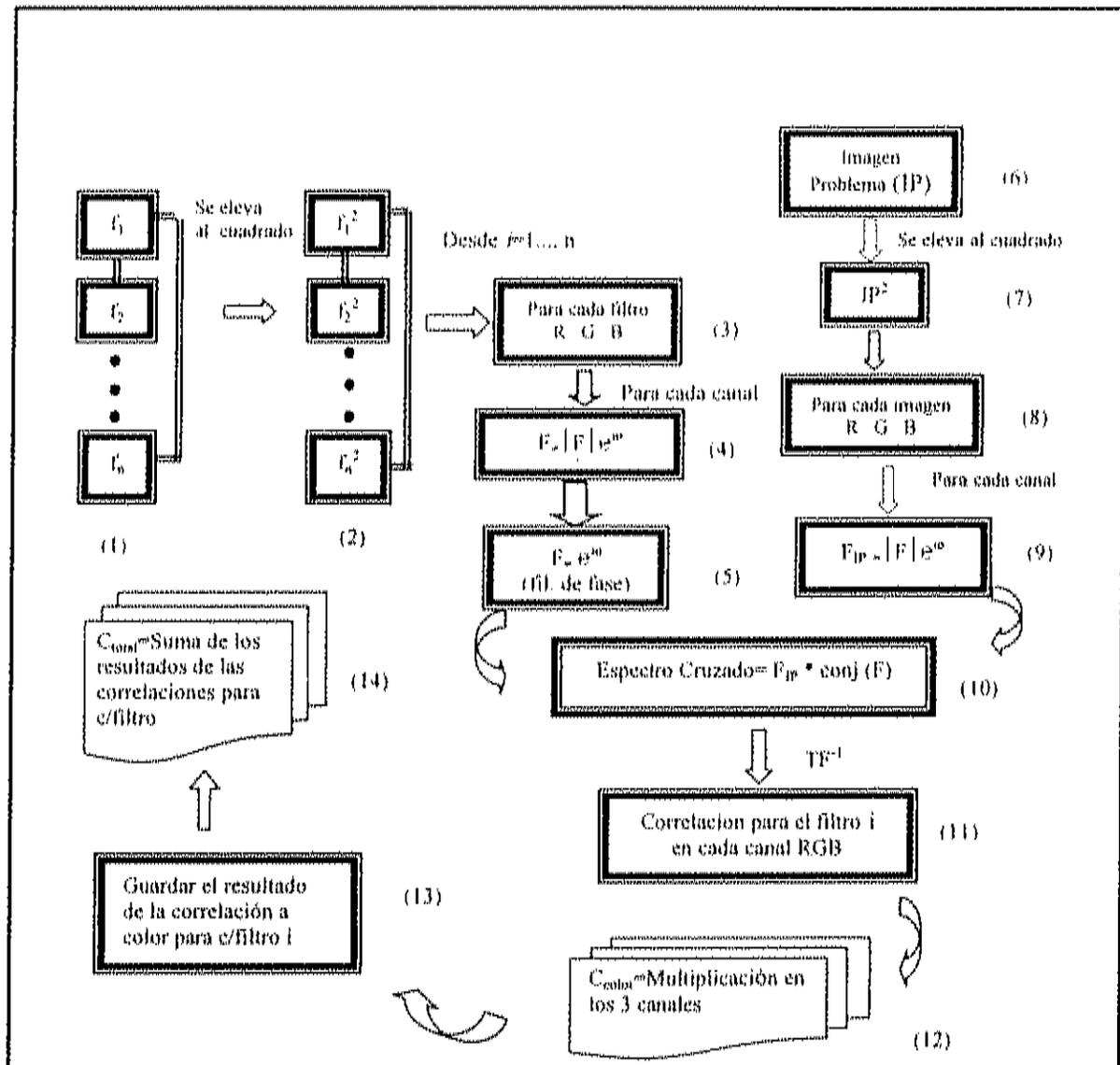


Figura 8.- Diagrama de flujo de la metodología de correlación a color del virus del síndrome de mancha blanca (WSSV).

5.10. Determinación del porcentaje de reconocimiento de cuerpos de inclusión de WSSV, utilizando correlación a color.

Para evaluar el funcionamiento del programa de reconocimiento de WSSV por correlación a color, fue necesario validar este método de diagnóstico determinando su sensibilidad y especificidad, utilizando un "gold estándar". Para ello se utilizaron las imágenes con secciones de tejidos de camarón infectados con WSSV y que exhibían los c.i. La sensibilidad y especificidad se determinó utilizando las siguientes fórmulas (modificado de Cameron, 2000):

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Resultados Verdaderos Positivos}}{\text{c.i. Presentes en la Imagen}} = \% \text{ Sensibilidad}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Resultados Verdaderos Negativos}}{\text{Imágenes Libres de c.i.}} = \% \text{ Especificidad}$$

Para la obtención de los datos, se llevaron a cabo conteos de cada uno de los cuerpos de inclusión presentes en las 300 imágenes, los resultados fueron comparados con cada una de su imagen correspondiente, generada por el programa de correlación a color. En la evaluación de la especificidad de la prueba, se utilizaron láminas histológicas con tejidos de camarón blanco (*L. vannamei*), con presencia de cuerpos de inclusión de IHNV (Virus de la Infección Hipodermal y Hematopoyética) como pruebas ciegas.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Infección Experimental

#### 6.1.1. Síntomas Externos de la Enfermedad.

Durante todos los bioensayos de infección con WSSV, los organismos no presentaron las características manchas blancas, observadas en especies asiáticas y que le da el nombre a esta enfermedad. Antes de iniciar los experimentos de infección, los organismos no presentaron signos de enfermedad ni de estrés (Fig. 9). En el transcurso de los primeros diez días post-infección, los principales síntomas fueron aletargamiento, anorexia, opacidad muscular, aumento en la frecuencia de muda y coloración rojiza en todo el cuerpo, especialmente; pleópodos, pereiópodos, urópodos y telson por expansión de los cromatóforos (Fig. 10). Posterior a este periodo crítico, los organismos aumentaron su actividad natatoria y apetencia alimenticia.

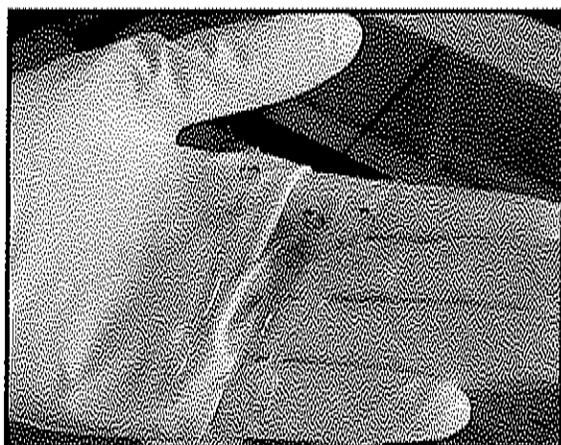


Figura 9.- Juveniles de *L. vannamei* antes de ser inoculados con WSSV, presentando la coloración característica de organismos sanos.

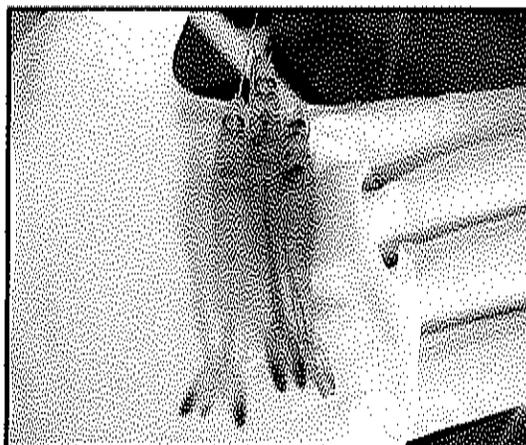


Figura 10.- Juveniles de *L. vannamei* al segundo día post-infección. En donde se observa la coloración rojiza en urópodos y telson.

En el transcurso de los bioensayos, se observó una mayor susceptibilidad de los juveniles de *L. vannamei* a la infección con WSSV cuando se administró oralmente (*Per os*). En el experimento dos, los valores de mortalidad acumulada alcanzaron el 66.7% al séptimo día post- infección (Fig. 11). Los organismos fueron menos susceptibles cuando la infección se indujo via inyección intramuscular. Los valores máximos de mortalidad acumulada se observaron en el experimento tres con 42.42% al sexto día post-infección. Se observó un aumento en la mortalidad conforme aumentó el volumen del inóculo ( Fig. 12).

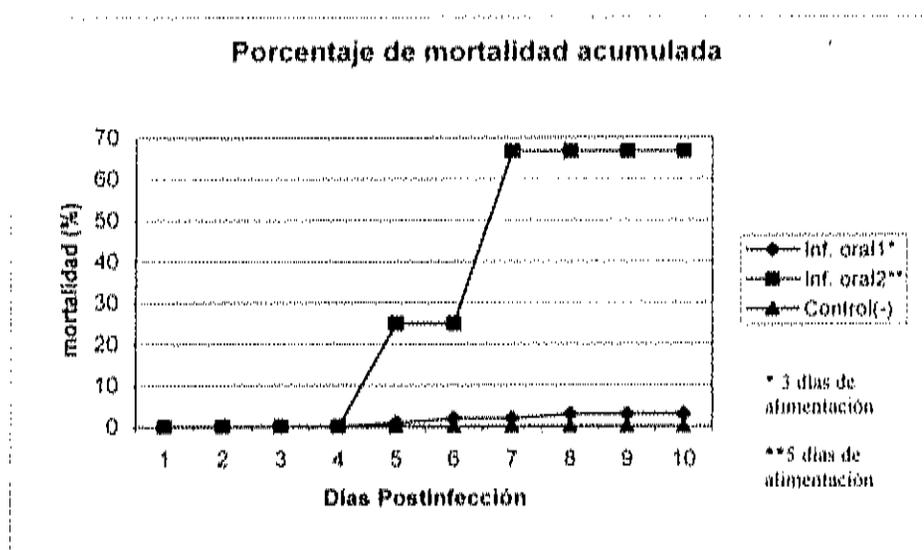


Figura 11.- Porcentaje de mortalidad acumulada de los dos bioensayos con juveniles de *L. vannamei* expuestos a WSSV mediante administración oral (*per os*).

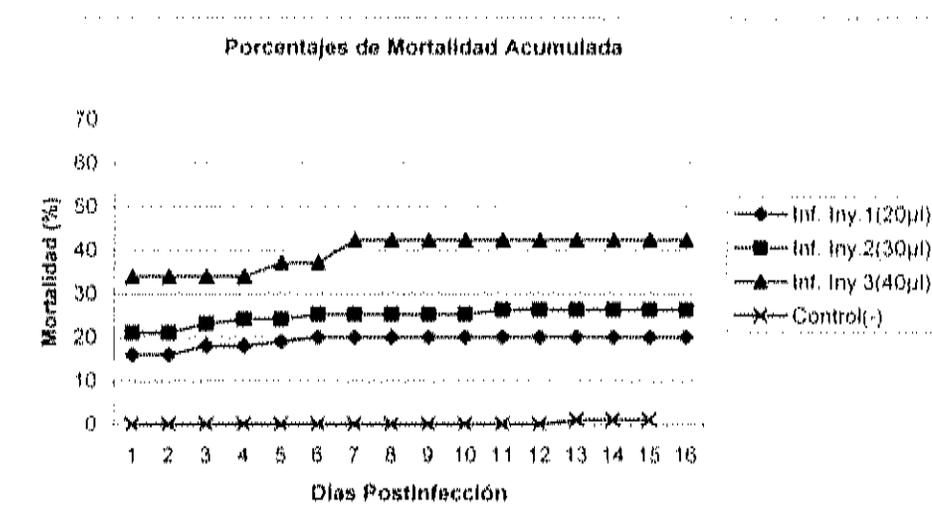


Figura 12.- Porcentaje de mortalidad acumulada de *L. vannamei* en los tres bioensayos de infección por inyección intramuscular con WSSV.

## 6.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

### 6.1.2.1. Infección *Per os*.

6.1.2.1.1. Experimento 1. Se colectaron en total 20 organismos que mostraron los síntomas externos de la enfermedad, durante los diez días que duró el experimento. Las muestras compuestas (pool) fueron analizadas utilizando el kit IQ2000 y el sistema WS1F/1R.

Los resultados obtenidos utilizando el kit IQ2000, revelaron la presencia de infección (ligera) a partir del segundo día de alimentación y hasta finalizar el experimento. Sin embargo, estos resultados no fueron constantes, ya que al sexto y octavo día post-infección, no se observó el fragmento de 296 pb del genoma viral que se amplifica con este kit (Fig. 13).

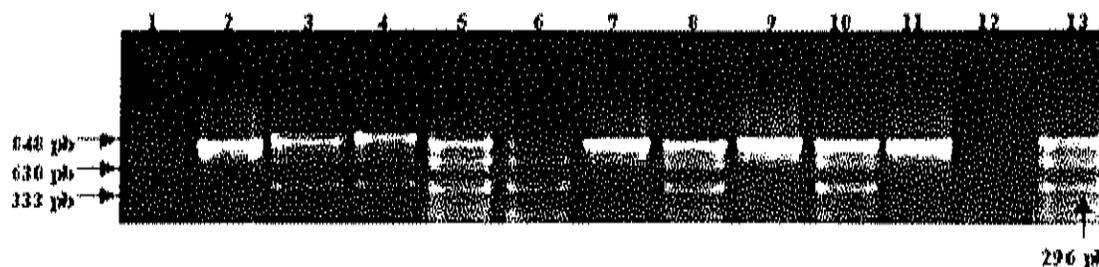


Figura 13.- Electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando el kit IQ2000, que muestra los patrones de amplificación de productos de PCR. Línea 1: Marcador de peso molecular; Línea 2: día 1 post-infección; Línea 3: día 2 post-infección, Línea 4: día 3 post-infección; Línea 5: día 4 post-infección; Línea 6: día 5 post-infección; Línea 7: día 6 post-infección; Línea 8: día 7 post-infección, Línea 9: día 8 post-infección; Línea 10: día 9 post-infección; Línea 11: día 10 post-infección, Línea 12: Control (-); Línea 13: Control (+).

Con el sistema WS1F/1R, los resultados fueron más concluyentes, debido a que fue posible observar el fragmento de 200 pb del genoma viral que amplifica este sistema, a partir del segundo día post-infección y hasta finalizar el experimento (Fig. 14).



Figura 14.- Análisis de PCR de ADN de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente, utilizando el sistema WS1F/1R. Línea 1: Marcador de peso molecular ( de 100 a 1000 pb); Línea 2: día 1 post-infección; Línea 3: día 2 post-infección, Línea 4: día 3 post-infección; Línea 5: día 4 post-infección; Línea 6: día 5 post-infección; Línea 7: día 6 post-infección; Línea 8: día 7 post-infección, Línea 9: día 8 post-infección; Línea 10: día 9 post-infección; Línea 11: día 10 post-infección, Línea 12: Control (-); Línea 13: Control (+).

6.1.2.1.2. Experimento 2. En este experimento, la colecta de muestras no fue tan frecuente como en el experimento anterior, debido a que se contaba con pocos organismos para realizar el experimento. Sólo se tomaron dos muestras; al primer y al séptimo día post-infección (7 juveniles *L. vannamei*). De cada muestreo se obtuvo un "pool" el cual fue analizado con los dos sistemas de PCR. Los resultados observados con ambos sistemas fueron positivos (Fig. 15 y 16).

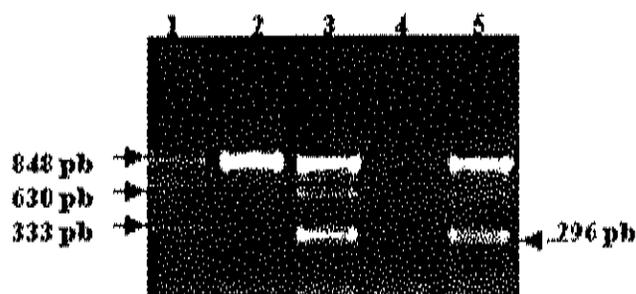


Figura 15 - Análisis de PCR, utilizando el kit IQ2000. ADN de juveniles de *L. vannamei* infectados oralmente con WSSV. Línea 1: Marcador de peso molecular; Línea 2: día 1 post-infección; Línea 3: día 2 post-infección, Línea 4: Control (-); Línea 5: Control (+).

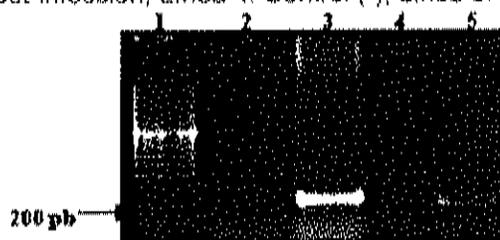


Figura 16.- Electroforesis de productos de PCR, utilizando el sistema WS1F/1R. Línea 1: Marcador de peso molecular (de 100 a 1000 pb); Línea 2: día 1 post-infección; Línea 3: día 2 post-infección, Línea 4: Control (-); Línea 5: Control (+).

#### 6.1.2.2. Infección por Inyección Intramuscular.

6.1.2.2.1. Experimento 1. La duración del experimento fue de 10 días. Se colectaron en total 33 organismos que mostraron los síntomas externos de la enfermedad. Las muestras fueron procesadas en "pools" de 3 organismos y analizadas utilizando el kit IQ2000 y el sistema WS1F/1R. En este experimento se tomaron muestras dos veces al día (mañana y noche), durante los dos primeros días. Con el kit IQ2000, se observó infección al segundo día de post-inoculación durante el muestreo de la noche. Sin embargo, en el muestreo de la mañana siguiente, los análisis no revelaron la presencia de infección. Es a partir del tercer día durante el muestreo nocturno y hasta finalizar el experimento, que en los análisis de PCR utilizando este kit, se observa con regularidad la presencia de infección por WSSV en los organismos colectados (Fig. 17).

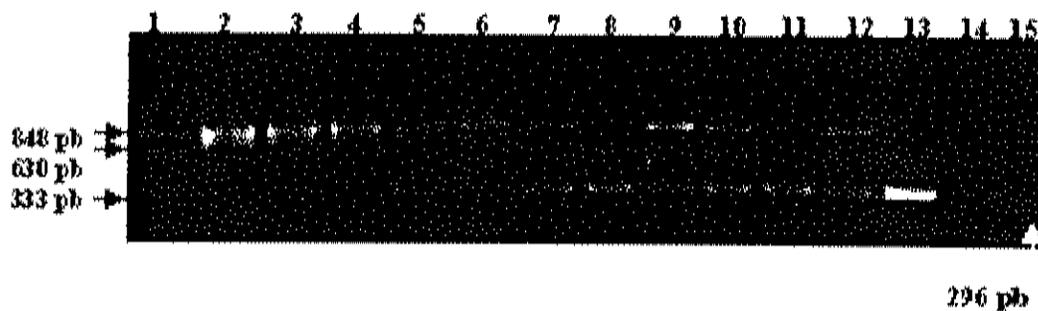


Figura 17.- Patrones de amplificación de productos de PCR, utilizando el kit IQ2000. Línea 1: Marcador de peso molecular; Línea 2: día 1 (a.m.) post-infección; Línea 3: día 1 (p.m.) post-infección; Línea 4: día 2 (a.m.) post-infección; Línea 5: día 2 (p.m.) post-infección; Línea 6: día 3 post-infección; Línea 7: día 4 post-infección; Línea 8: día 5 post-infección; Línea 9: día 6 post-infección; Línea 10: día 7 post-infección; Línea 11: día 8 post-infección; Línea 12: día 9 post-infección; Línea 13: día 10 post-infección; Línea 14: Control (-); Línea 15: Control (+).

Los resultados obtenidos con el sistema WS1F/1R, revelaron infección por WSSV en los organismos colectados, a partir del primer día post-inoculación y hasta finalizar el experimento.

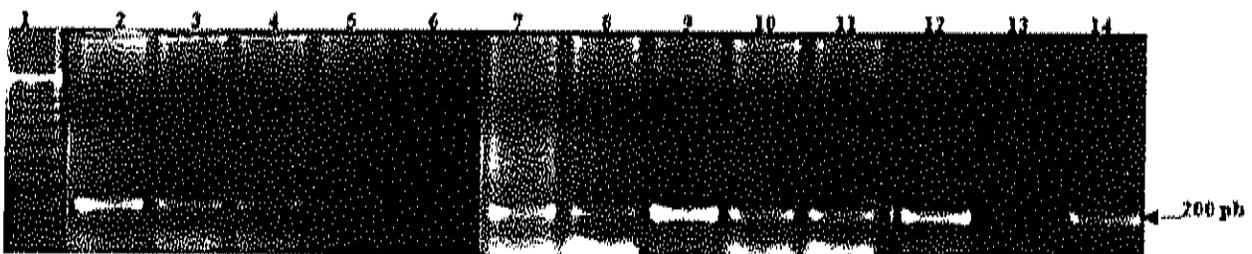


Figura 18.- Visualización de productos de PCR con el sistema WS1F/1R, en gel de agarosa al 2%. ADN de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con WSSV, vía inyección intramuscular. Línea 1: Marcador de peso molecular (de 100 a 1000 pb); Línea 2: día 1 post-infección; Línea 3: día 2 post-infección; Línea 4: día 3 post-infección; Línea 5: día 4 post-infección; Línea 6: día 5 post-infección; Línea 7: día 6 post-infección; Línea 8: día 7 post-infección; Línea 9: día 8 post-infección; Línea 10: día 9 post-infección; Línea 11: día 10 post-infección; Línea 12: Control (-); Línea 13: Control (+).

6.1.2.2.2. Experimento 2. Durante los 15 días que duró el experimento, se colectaron 13 organismos que fueron procesados por PCR utilizando el kit IQ2000 y el sistema WS1R/1F. La colecta se hizo cada tercer día y como en los experimentos anteriores, se obtuvieron "pools" de pleópodos y branquias de los organismos que mostraban los síntomas externos de la enfermedad.

Las muestras procesadas con el kit IQ2000, revelaron la presencia de infección con WSSV en los organismos colectados al décimo y doceavo día post-inoculación. En los días posteriores y hasta finalizar el experimento, no se volvió a observar el fragmento de 296 pb del genoma viral que se amplifica con este kit (Fig. 19).

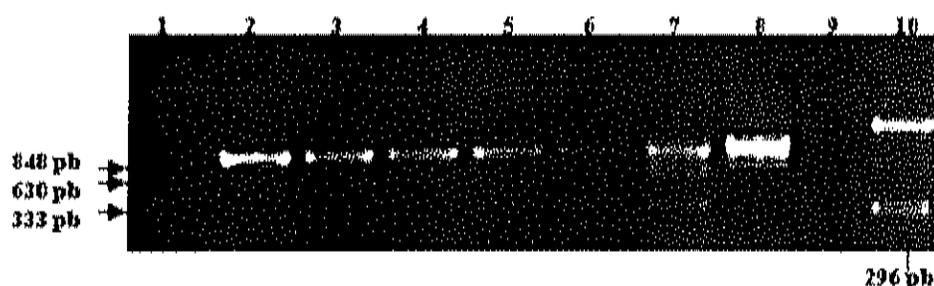


Figura 19.- Visualización de productos de PCR , en gel de agarosa al 2%. ADN de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con WSSV. Línea 1: Marcador de peso molecular; Línea 2: día 2 post-infección; Línea 3: día 4 post-infección; Línea 4: día 6 post-infección; Línea 5: día 8 post-infección; Línea 6: día 10 post-infección; Línea 7: día 12 post-infección; Línea 8: día 14 post-infección; Línea 9: Control (-), Línea 10: Control (+).

Por otro lado, las muestras procesadas con el sistema WS1F/1R revelaron la presencia de infección en los organismos, a partir del primer día post-inoculación. Los resultados positivos, se mantuvieron constantes durante todo el experimento (Fig. 20).

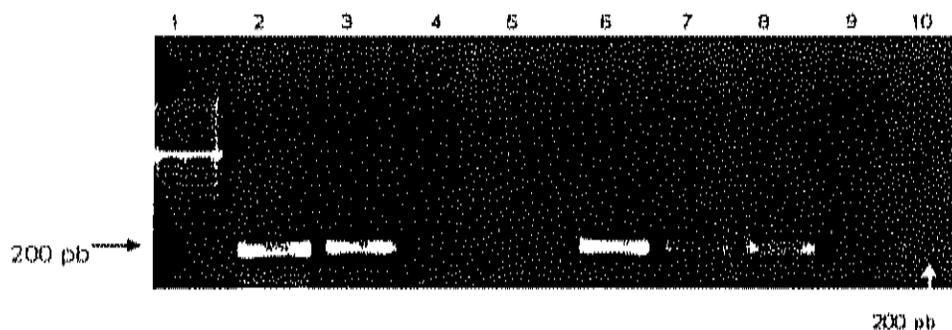


Figura 20.- Electroforesis de productos de PCR de ADN de juveniles de *L. vannamei* infectados experimentalmente con WSSV. Línea 1: Marcador de peso molecular (de 100 a 1000 pb); Línea 2: día 2 post-infección; Línea 3: día 4 post-infección; Línea 4: día 6 post-infección; Línea 5: día 8 post-infección; Línea 6: día 10 post-infección; Línea 7: día 12 post-infección; Línea 8: día 14 post-infección; Línea 9: Control (-), Línea 10: Control (+).

6.1.2.2.3. Experimento 3. Se procesaron por PCR 14 organismos durante los 10 días que duró el experimento. Como en el experimento anterior, la colecta de los organismo se realizó cada tercer día y bajo las mismas condiciones.

Los resultados obtenidos utilizando el kit IQ2000, no revelan la presencia de infección con WSSV en los organismos colectados (Fig. 21). Sin embargo, con el sistema WS1F/1R, si fue posible visualizar el fragmento de 200 pb del genoma viral que se amplifica con este sistema, a partir del segundo día post-infección y en los subsecuentes muestreos (Fig. 22).

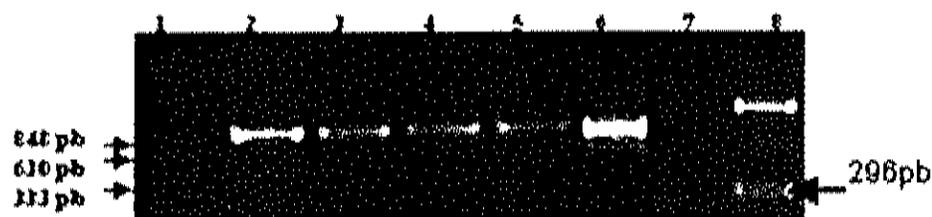


Figura 21.- Análisis de PCR utilizando el kit IQ2000. Línea 1: Marcador de peso molecular; Línea 2: día 2 post-infección; Línea 3: día 4 post-infección; Línea 4: día 6 post-infección; Línea 5: día 8 post-infección; línea 6: día 10 post-infección; Línea 7: Control (-), Línea 8: Control (+).

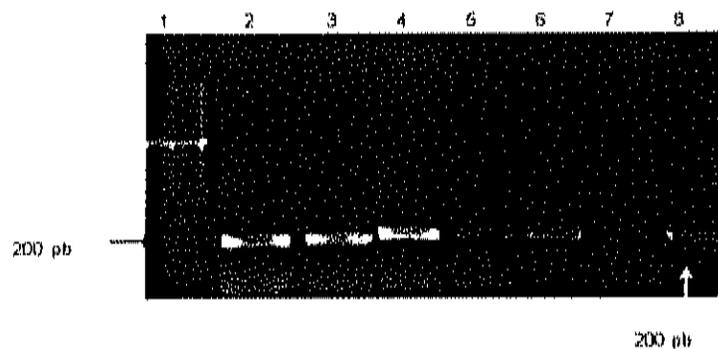


Figura 22.- Patrones de amplificación de productos de PCR, utilizando el sistema WS1F/1R. Línea 1: Marcador de peso molecular (de 100 a 1000 pb); Línea 2: día 2 post-infección; Línea 3: día 4 post-infección; Línea 4: día 6 post-infección; Línea 5: día 8 post-infección; línea 6: día 10 post-infección; Línea 7: Control (-), Línea 8: Control (+).

### 6.1.3. Histología.

En el transcurso de los 5 experimentos de infección experimental, se procesaron en total 92 organismos colectados, los cuales fueron utilizados tanto para los análisis de PCR como para histología.

Como se pudo observar en los análisis por PCR, en todos los experimentos se indujo la infección en juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) con WSSV. Los principales cambios histológicos observados fueron: infiltración hemocítica, hipertrofia nuclear, muerte celular o necrosis (picnosis y caryorrhexis) y formación de esferoides, principalmente en tejido epitelial de branquias y cutícula, (Fig. 23 y 24).

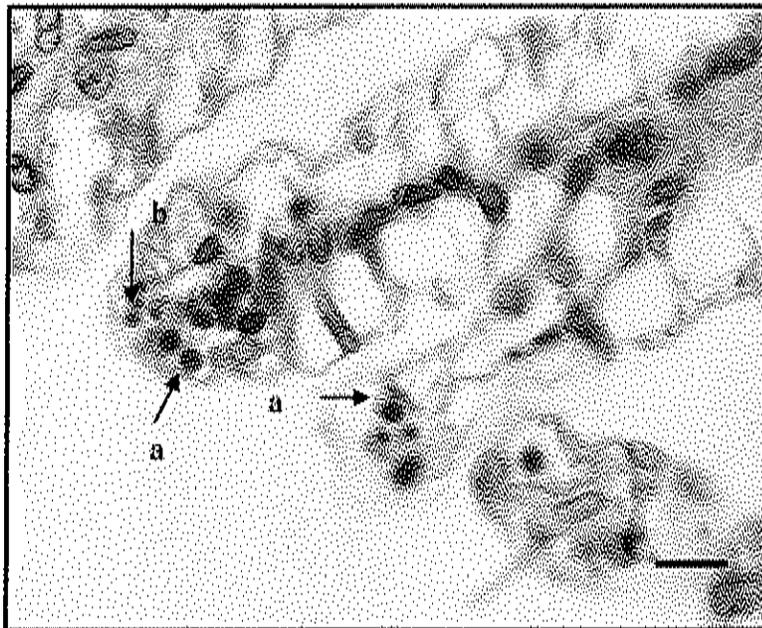


Figura 23.- Sección longitudinal de branquias de juvenil de *L. vannamei*, infectado experimentalmente con WSSV. Se observan anomalías histológicas: picnosis (a) y caryorrhexis (b). Aumento 600X. Barra = 2.92  $\mu\text{m}$ . Tinción hematoxilina-eosina (H&E).

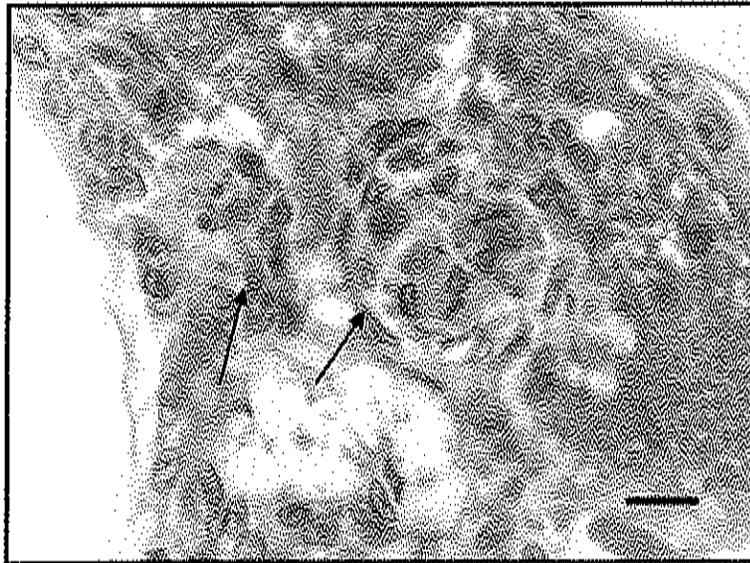


Figura 24.- Anormalidades histológicas observadas en *L. vannamei*, infectado experimentalmente con WSSV. Esferoides ectópicos (flechas) en epitelio cuticular de branquias. Tinción H&E. 600X. Barra = 2.92  $\mu$ m.

De los 92 organismos analizados, fue posible observar los cuerpos de inclusión de WSSV solamente en 5 organismos; 2 de ellos obtenidos durante la primera infección por inyección intramuscular y 3 como resultado de la segunda infección por administración oral de tejido infectado. Los cuerpos de inclusión se hicieron patentes a partir del sexto día post-infección. Las células epiteliales del tracto digestivo, branquias y tejido hematopoyético exhibieron núcleos hipertrofiados, anillo de cromatina poco marcado y en ocasiones anillo de cromatina interrumpido, los cuerpos de inclusión presentes durante los estados tempranos de la infección mostraron una coloración eosinófila (Fig. 25). A medida que la infección progresó, los núcleos aumentaron de tamaño y la reacción de tinción cambió de eosinófila a basófila (Fig. 26). Así mismo, aumentó el número de órganos y tejidos que exhibieron cuerpos de inclusión intranucleares: órgano linfoide, corazón, glándula antenal, glándulas del tegumento, tejido nervioso, epitelio cuticular y tejido conectivo.

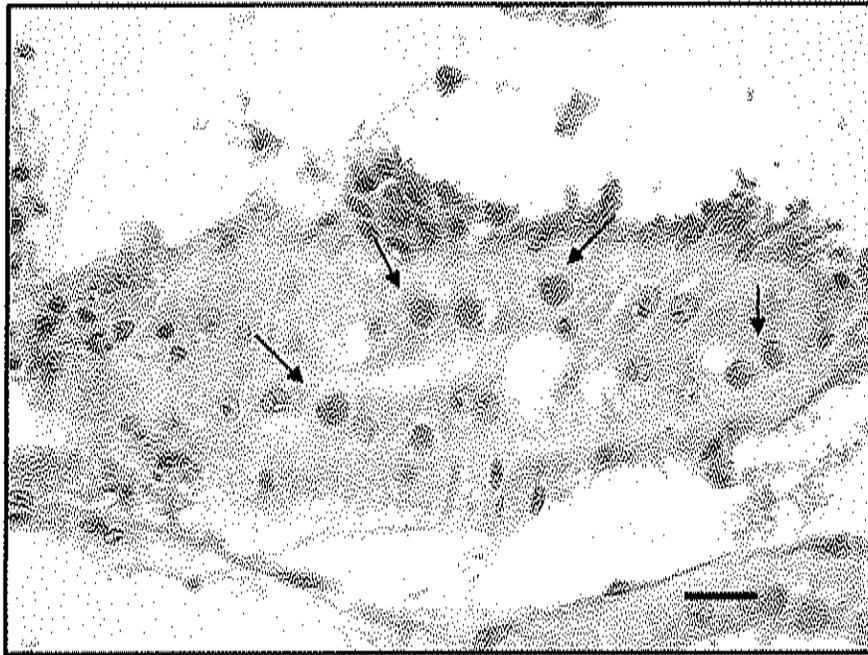


Figura 25.- Lesiones características de WSSV, en un corte longitudinal de la glándula antenal de un juvenil de *L. vannamei*. Se observan inclusiones intranucleares eosinófilas (flechas). Tinción H&E. 600X. Barra = 2.92  $\mu$ m.



Figura 26.- Corte longitudinal de una sección de epitelio cuticular de juvenil de *L. vannamei*, infectado experimentalmente con WSSV. Se observan lesiones características del virus de mancha blanca basófilas (flechas). Tinción H&E. 600X. Barra = 2.92  $\mu$ m.

## 6.2. Hibridación *in situ*.

Para desarrollar la base de datos para la técnicas de correlación invariante, fue necesario asegurar que los cuerpos de inclusión con que sería alimentado el sistema pertenecieran efectivamente a WSSV. Para llevar a cabo esto, fue necesario contar con una técnica suficientemente específica como es hibridación *in situ*.

Se procesaron 20 laminillas; 5 laminillas histológicas procedentes de los organismos que exhibieron inclusiones intranucleares producto de las infecciones experimentales y 15 laminillas obtenidas del acervo histológico con el que cuenta el CIAD Mazatlán.

Se observaron reacciones positivas a la sonda de WSSV marcada químicamente con digoxigenina, principalmente en branquias, epitelio cuticular, epitelio del estómago, tejido conectivo y glándula antenal (Figuras 27 y 28). En las láminas que sirvieron como controles negativos no se observó ninguna reacción (Figura 29).

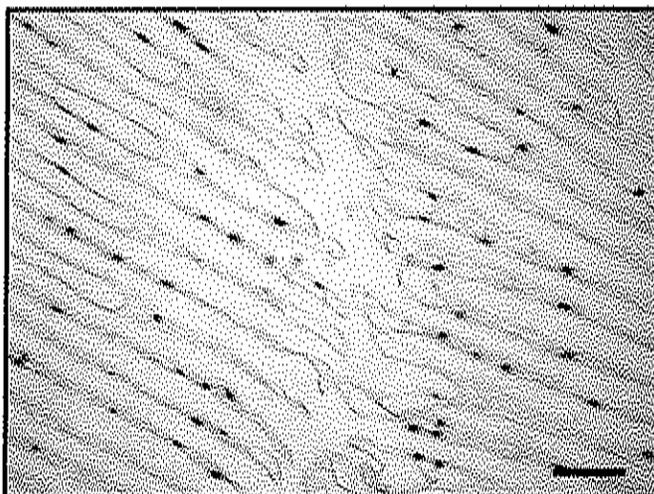


Figura 27.- Sección longitudinal de branquias de juvenil de *L. vannamei* infectado con WSSV. Se observa el precipitado azul producto de la Fosfatasa Alcalina (FA), que ha sido ligada a la sonda marcada con digoxigenina via el anticuerpo anti-dig. El precipitado indica la localización del ADN de WSSV. Tinción de diferenciación con café de Bismarck, 400X, Barra = 4.38  $\mu$ m.

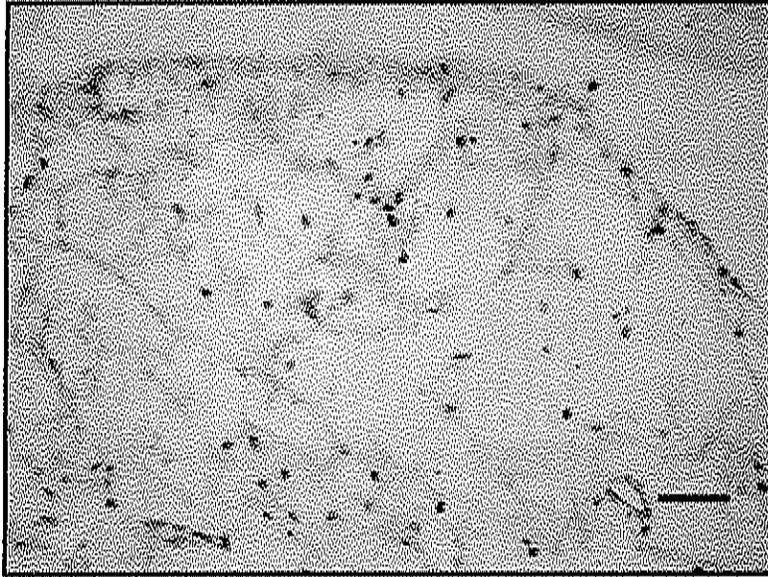


Figura 28.- Reacción positiva (precipitado azul) a la sonda de WSSV marcada con digoxigenina. Sección de un corte longitudinal de tejido conectivo en un juvenil de *L. vannamei*. Tinción de diferenciación con café de Bismark. 400X. Barra = 4.38  $\mu\text{m}$ .

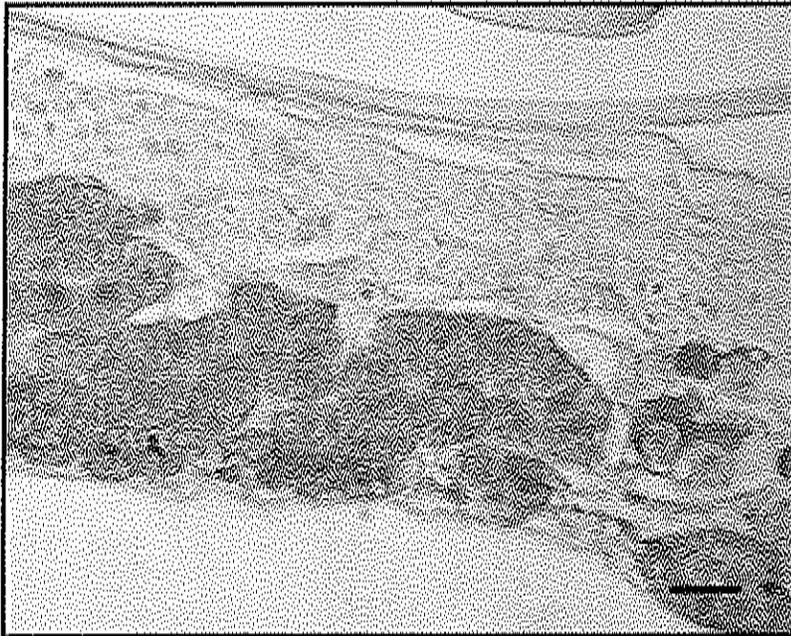
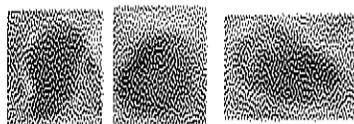


Figura 29.- Corte longitudinal de una sección de tejido epitelial de organismos no infectados con WSSV. Tinción de diferenciación con café de Bismarck. 400X. Barra = 4.38  $\mu\text{m}$ .

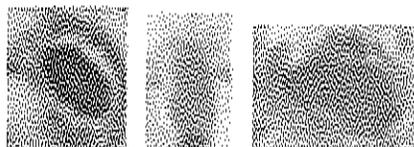
### 6.3. Reconocimiento de los Cuerpos de Inclusión de WSSV, mediante Correlación a Color.

Se tomaron 300 imágenes de láminas histológicas de diferentes órganos y tejidos, de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*), para constituir la base de datos, basándose en ella, se diseñó el programa de procesamiento de imágenes para el reconocimiento de los cuerpos de inclusión de WSSV.

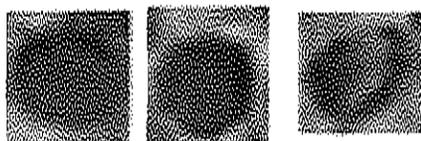
Teniendo en cuenta que los cuerpos de inclusión de WSSV tienen diferentes morfologías y tonos de coloración (con tinción hematoxilina de Harris -eosina Floxin) durante el desarrollo de la enfermedad; se hizo una clasificación de las diferentes morfologías para facilitar la elaboración de los filtros. Se hicieron 5 clasificaciones de los cuerpos de inclusión de WSSV observados. Los cuales se presentan a continuación.



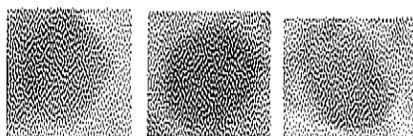
Tipo1.- Cuerpos de inclusión (C.I.) donde se observa un ligero halo claro rodeando la parte central fuertemente eosinófila que cubre  $\frac{3}{4}$  partes o más de la célula, cromatina marginal interrumpida o poco visible y en ocasiones más marcada.



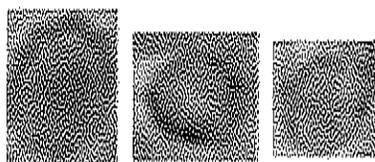
Tipo 2.- Cuerpos de inclusión tipo Cowdry A en el que se observa un halo claro bien marcado entre la parte central eosinófila a veces fuerte a veces clara y la orilla que puede estar bien marcada con cromalina como la de la primera fotografía o estar difusa como en las otras dos



Tipo 3.- Cuerpos de inclusión de fuertemente eosinófilos a ligeramente basófilos, cubriendo por completo la célula. Siempre se observa cromatina marginal marcada.



Tipo 4.- Cuerpo de inclusión eosinófilo o ligeramente basófilo cubriendo por completo la célula. Cromatina marginal ausente.



Tipo 5.- Cuerpos de inclusión eosinófilos o basófilos llenando por completo la célula, cromatina marginal interrumpida o poco visible.

### **Reconocimiento de los cuerpos de inclusión de WSSV por correlación a color.**

Como se mencionó anteriormente, se analizaron 300 imágenes para evaluar la sensibilidad y especificidad del programa de reconocimiento por correlación a color. En la figura 30 y 31 se presentan ejemplos de imágenes, donde se obtuvo un reconocimiento eficiente de los cuerpos de inclusión de WSSV.

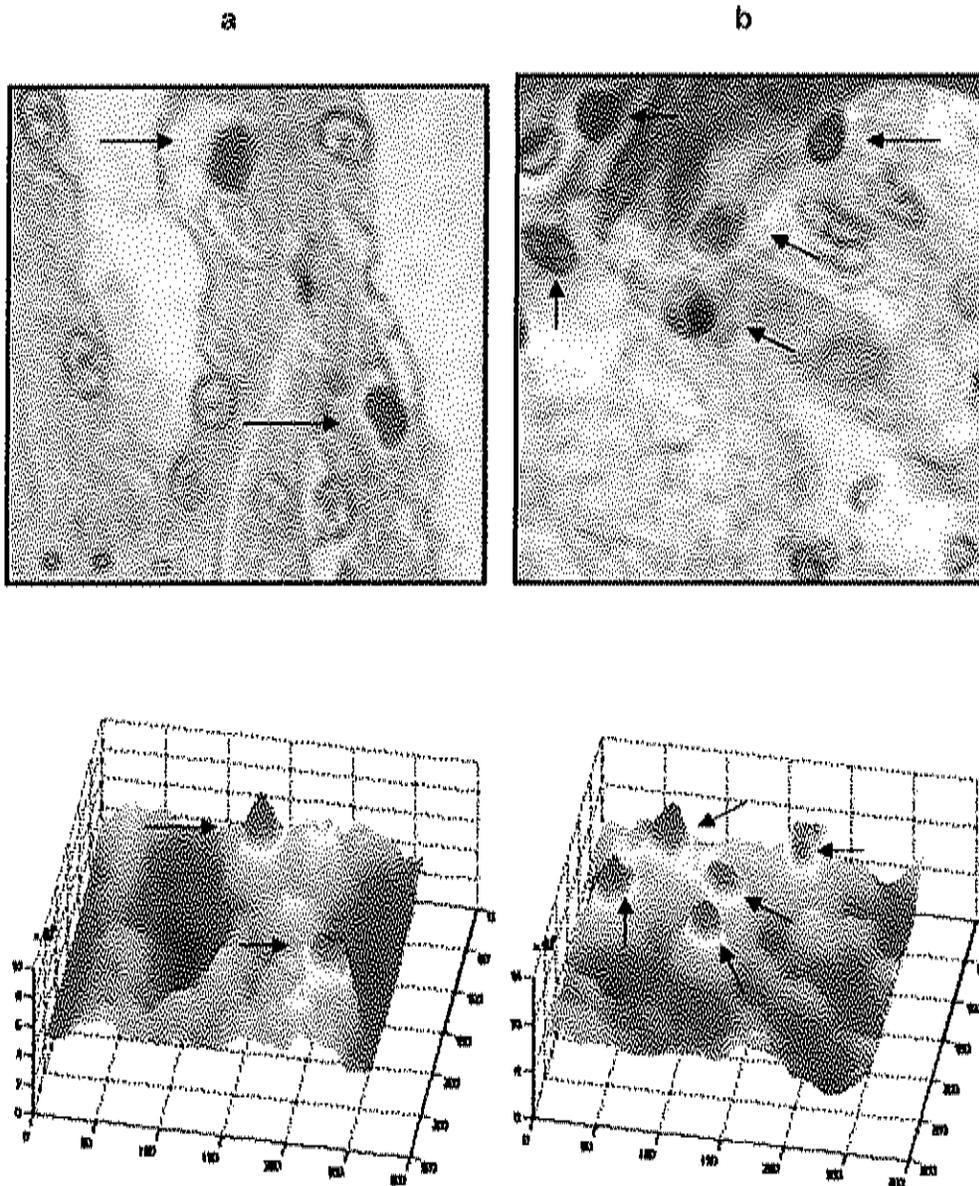


Figura 30.- Imágenes de cuerpos de inclusión de WSSV en una sección de glándula antenal (a) y en tejido epitelial de branquia (b). En las gráficas generadas por el programa de correlación a color con filtros de fase, se observa un reconocimiento eficiente.

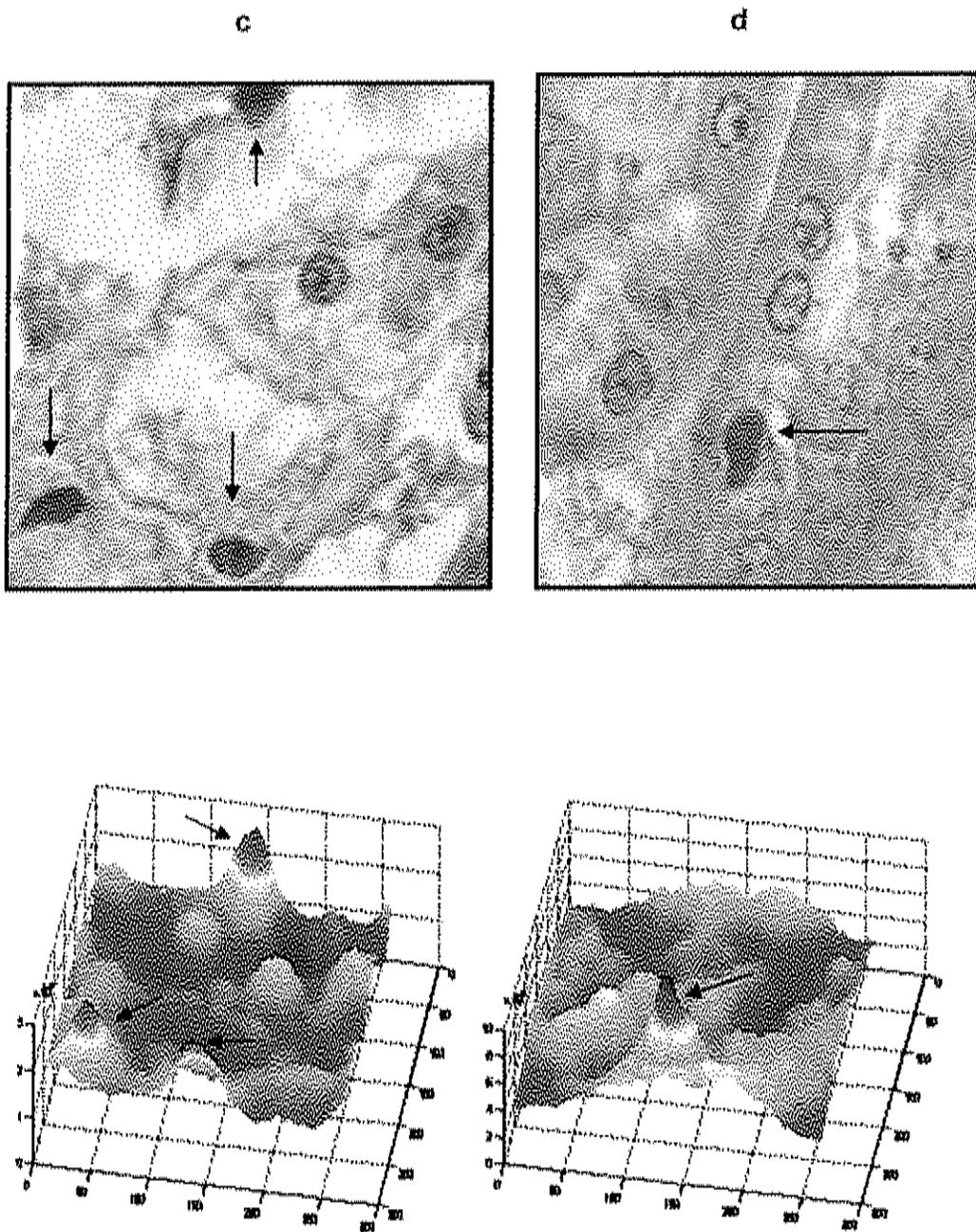


Figura 31.- Imágenes de cuerpos de inclusión de WSSV en una sección de tejido conectivo (c) y en glándula antenal (d). En las gráficas se observa un reconocimiento eficiente a través del programa de correlación a color con filtros de fase.

En la figura 32 y 33 se muestran imágenes donde el ruido de fondo generado por otros elementos presentes en las imágenes, representan un problema para el reconocimiento de los cuerpos de inclusión de WSSV.

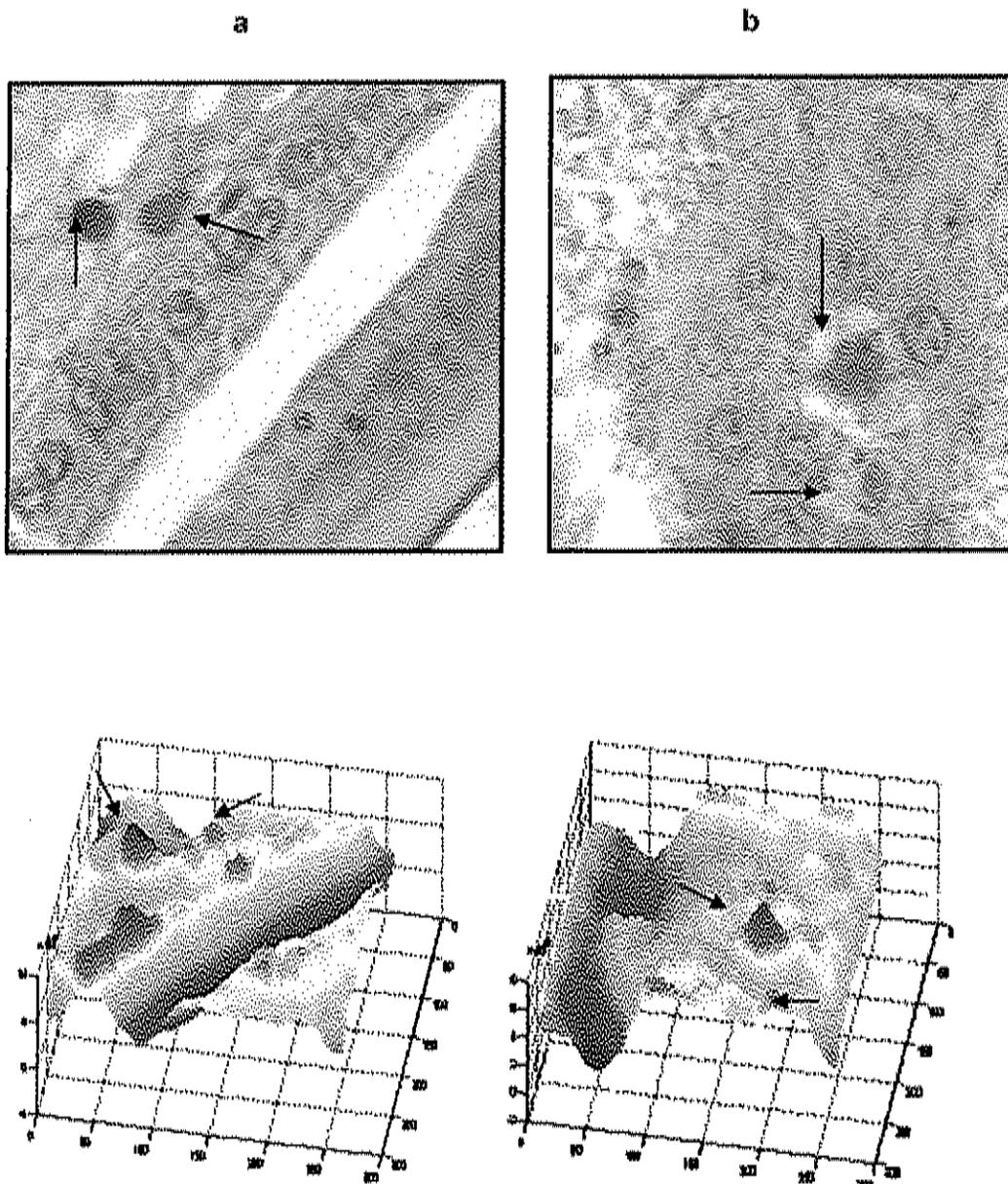


Figura 32.- Imágenes de cuerpos de inclusión con WSSV en una sección de tejido epitelial (a) y en glándula antenal (b). En las gráficas generadas por el programa de correlación a color con filtros de fase, se observan picos falsos (+).

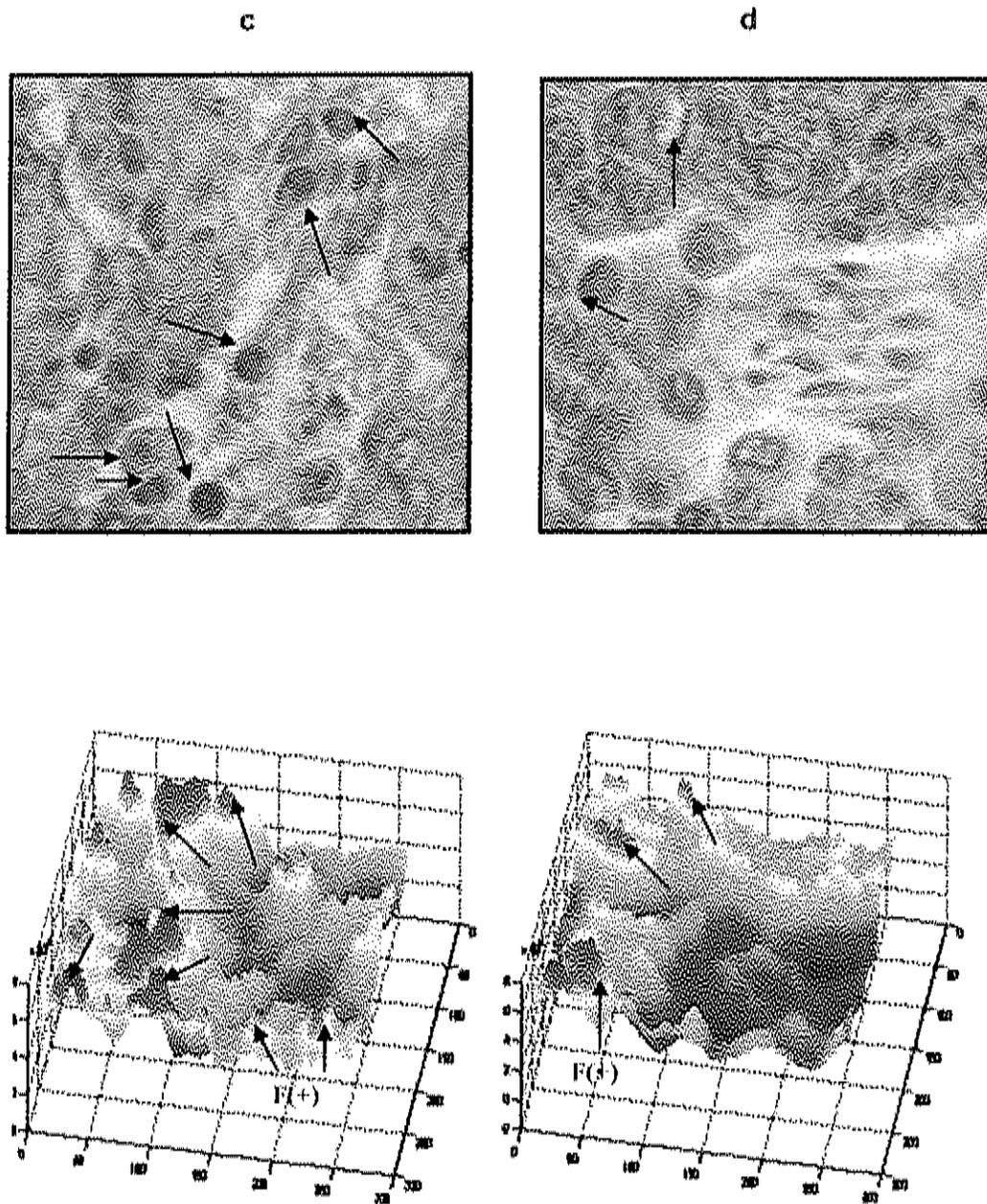


Figura 33.- Imágenes de cuerpos de inclusión con WSSV en una sección del órganos linfoide (c) y en tejido hematopoyético (d). En las gráficas generadas por el programa de correlación a color con filtros de fase, se observan picos falsos (+).

En la tabla 2 se resumen los resultados del número de cuerpos de inclusión (c.i.) reales de WSSV encontrados en las láminas histológicas, el número de c.i. reconocidos por el sistema de correlación a color, así como los falsos positivos y falsos negativos generados por este programa de reconocimiento digital.

Tabla 2.- Resultados de cuerpos de inclusión presentes en láminas histológicas con tejidos de camarón infectado con WSSV. Así como, resultados del número de c.i. presentes en las pruebas ciegas (IHHNV).

Estatus real de # de c.i.			
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	1369 positivos	179 falsos positivos	1548
Negativos	221 falsos negativos	5 negativos	226
Total	1590 c.i. Positivos	184	1774

Los resultados de sensibilidad y especificidad del programa de reconocimiento de cuerpos de inclusión de WSSV, por correlación a color con filtros de fase con invariancias observados, fueron los siguientes:

Sensibilidad = 86.1%

Especificidad= 2.71%

Las imágenes de los tejidos, donde el sistema presentó los porcentajes de reconocimiento más altos fueron en tejido nervioso y glándulas del tegumento con 100% de reconocimiento. Los valores más bajos se observaron en epitelio del estómago y en secciones de tejido del corazón con 78.4% y 69%, respectivamente.

En los tejidos en donde el sistema presentó un menor poder de discriminación fue en órgano linfoide y tejido hematopoyético. En estos tejidos se observaron cuerpos de inclusión falsos positivos en promedio de 6 y 11 respectivamente.

Se construyeron intervalos de confianza del 95%, para conocer la media poblacional de los resultados en los porcentajes de reconocimiento de WSSV en cada uno de los tejidos por medio del sistema de correlación a color. El valor calculado es  $r$ , el coeficiente de correlación de la muestra, pero no es el verdadero coeficiente de correlación  $\rho$  (cuando es tomada en cuenta toda la población), por eso los intervalos de confianza. Como  $r$  no tiene una distribución normal, aunque el tamaño de la muestra se incremente (aquí el teorema del límite central no se puede cumplir), se puede transformar ésta variable  $r$  en otra variable aleatoria si suponemos que los datos están distribuidos en una distribución normal bivariada. Así que se emplea la transformación  $Z$  de Fisher que tiene una distribución normal con promedio  $\mu$  y  $\sigma$  el cual está en función de la  $\rho$ , el verdadero coeficiente de correlación, el cual no se conoce. Los resultados de estos intervalos de confianza se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.- Intervalos de confianza del 95% de resultados de reconocimiento de WSSV, utilizando el sistema de correlación a color.

TEJIDOS	r	INTERVALO DE CONFIANZA DEL 95%
Branquias	.85	0.7857-0.8961 (n=102)
Tejido conectivo	.82	0.6225-0.9193 (n=24)
Glándula antenal	.84	0.7302-0.9075 (n=48)
Epitelio cuticular	.85	0.7560-0.9096 (n=57)
Órgano linfoide	.93	0.7978-0.9768 (n=15)
Tejido nervioso	1.00	0.9526-1.000 (n=9)
Músculo estriado	.88	0.2394-0.9868 (n=6)
Tejido hematopoyético	.84	0.1541-0.9540 (n=12)
Corazón	.69	0.0479-0.9285 (n=9)
Epitelio del estómago	.78	0.4459-0.9233 (n=15)
Glándulas del tegumento	1.00	No se puede calcular debido al tamaño de muestra (n=3), el cual es un dato insuficiente.

Así mismo, con el fin de determinar si existe relación entre c.i. falsos positivos, falsos negativos, así como en el número promedio éstos, en los diferentes órganos y tejidos de organismos analizados histológicamente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. En base a los resultados obtenidos, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ).

## 7. DISCUSION.

La sustentabilidad y el desarrollo del cultivo de camarón se encuentran en riesgo, debido a problemas vinculados con la degradación del medio ambiente y a enfermedades infecciosas principalmente de etiología viral. El traslado de camarones vivos o procesados de una región a otra del mundo, sin un estricto control de salud de los organismos, ha contribuido a la dispersión de enfermedades. El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), es un claro ejemplo de cómo la falta de conocimiento sobre aspectos fisiológicos y patológicos del camarón, así como el escaso entendimiento de las enfermedades infecciosas, pueden provocar el derrumbe de una de las industrias de cultivo más rentables a nivel mundial.

Por consiguiente, el control de las enfermedades se ha convertido en una prioridad en los países productores de camarón, si se busca que la producción sea ecológica y económicamente sustentable. Lo anterior, va a depender del equilibrio entre: 1) la calidad del medio ambiente, 2) estado de salud del camarón y 3) un diagnóstico oportuno que permita llevar a cabo estrategias de control, para minimizar los efectos de las enfermedades y el estudio epidemiológico de los patógenos (Bachère 2000).

La prevención y el control de las enfermedades de camarones, requiere de la generación de información confiable que sea capaz de predecir patrones de enfermedades y diseñar técnicas de manejo para prevenir o controlar su ocurrencia. En este contexto, la aplicación de técnicas epidemiológicas (estudios de factores de riesgo, análisis de riesgo, modelación de enfermedades infecciosas, evaluación de pruebas de diagnóstico y estudios experimentales) permiten detectar, entender las causas y controlar las

enfermedades infecciosas en poblaciones de organismos silvestres o bajo cualquier sistema de cultivo.

Para llevar a cabo estudios epidemiológicos sobre enfermedades infecciosas en poblaciones de camarones, es necesario contar con métodos de diagnóstico donde los resultados obtenidos sean repetibles y reproducibles, es decir, que cuenten con un nivel aceptable de precisión y de confianza. Un método de diagnóstico comúnmente utilizado en patología de camarones es la histología. Sin embargo, su mayor desventaja es el intervalo de tiempo que se requiere para obtener un diagnóstico confiable.

En este sentido, se llevó a cabo este trabajo para evaluar el uso de sistemas digitales de correlación a color para realizar de forma automatizada el reconocimiento de cuerpos de inclusión (c.i.) de WSSV en tejidos de camarón y facilitar la obtención de información que tendría importantes aplicaciones en la investigación, programas de vigilancia, certificación de zonas libres de patógenos, estimación de prevalencia y estudios epidemiológicos de esta enfermedad.

### 7.1. Infección Experimental

En el presente estudio, se realizaron cinco bioensayos de infección experimental, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de variaciones morfológicas de c.i. presentes en camarones con infecciones tempranas, ya que se contaba con la colección de láminas histológicas de camarones con infecciones agudas y crónicas con WSSV, propiedad del CIAD Mazatlán. Como rutas de infección se utilizaron la inyección intramuscular y *per os*.

En el transcurso de los bioensayos de infección experimental los signos externos que presentaron los organismos dentro de la primera semana post-infección coinciden con los reportados por otros autores (Kanchanaphum *et al.*, 1998; Yohanandhan *et al.*, 2003), difieren sin embargo, en la presencia de manchas blancas presentes en el exoesqueleto y que parecen ser características en especies de camarones asiáticos. En las dos rutas de infección experimental utilizadas, los camarones infectados se volvieron letárgicos y anoréxicos 24 hr post-infección. Sin embargo, la coloración rojiza de cuerpo y urópodos por expansión de los cromatóforos, se observó 24 hr post-infección vía inyección intramuscular, mientras que por ingestión se observó 5 días post-infección, esto se debió posiblemente a que se causó un mayor estrés en los organismos inyectados. Esta posibilidad está sustentada por las observaciones hechas por Sahul Hameed *et al.* (1998), en infecciones experimentales vía inyección intramuscular con WSSV en *P. monodon* y *P. japonicus*, en donde la coloración rojiza en cuerpo y urópodos se observó a partir de las 24 horas post-inoculación.

Aunque el objetivo de este estudio no estuvo encaminado a observar las diferencias en cuanto a la susceptibilidad de juveniles de *L. vannamei* a WSSV, debido a que en el diseño experimental de las infecciones, no se controlaron factores como; origen de los organismos, edad, alimentación, calidad del inóculo, calidad de agua, etc. El comportamiento que se observó difiere con lo reportado por Chou *et al.* (1998) y Sahul Hameed, *et al.* (1999), ellos observaron que los organismos fueron más susceptibles a la infección cuando se inocularon vía inyección intramuscular y reportaron mortalidades acumuladas del 100% dentro de la primera semana post-infección. En este trabajo de experimentación, la mayor mortalidad acumulada se observó en el experimento 2 de infección oral con un 66.7%, mientras que en las infecciones por inyección se registraron un 20%, 27% y 42% de mortalidad acumulada en los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente. Debido a que no se observaron c.i. de

WSSV en las preparaciones histológicas obtenidas al final de cada experimento de infección, el volumen del inóculo administrado a los organismos en cada uno de los experimentos se aumentó sistemáticamente. Posiblemente, la mortalidad ascendente observada en los 3 experimentos de infección por inyección se debió a este hecho, ya que las mayores mortalidades se registraron al primer día post-infección, probablemente como consecuencia al estrés producido al inyectar a los organismos y no tanto por la carga viral del inóculo. Otro factor a considerar son los bajos niveles de mortalidad acumulada observados en el presente estudio con respecto a estudios realizados por otros investigadores, éstos pudieron ser debidos a variaciones en la virulencia de la cepa de WSSV con la que se elaboró el inóculo. Wang *et al.* (1999) encontraron diferencias en la virulencia de 6 cepas de WSSV en un estudio realizado con camarones americanos. Estas diferencias, se deben a la presencia de variaciones genéticas entre cepas de WSSV detectadas por análisis de RFLP (Chang *et al.* 2001).

Por otro lado, existen estudios de infección experimental, donde se ha observado que el WSSV puede ser más virulento en algunas especies de camarones (*Penaeus monodon*, *P. japonicus*) y menos en otras especies (*Farfantepenaeus duorarum*, *Macrobrachium rosenbergii*) (Wang *et al.* 1999; Sahul Hameed *et al.* 2000). La evolución de los niveles de virulencia es determinada por la relación patógeno-hospedero y es afectada por factores como la mutación, coinfección o superinfección, el modo de transmisión, susceptibilidad y heterogeneidad del hospedero (Gasunov *et al.* 2002). Los patógenos en poblaciones heterogéneas evolucionan para ser menos virulentos que los patógenos adaptados a un sólo tipo de hospedero. Por lo tanto, si más de una población de hospederos es afectada por una cepa de un patógeno en particular, la virulencia no puede incrementarse en todas las poblaciones infectadas simultáneamente (Ebert y Hamilton 1996).

El WSSV es conocido por afectar un amplio número de crustáceos. Sin embargo, no produce los mismos efectos entre las diferentes poblaciones de estos organismos. Mientras que en cangrejos y langostas infectados con WSSV no se observan efectos importantes de la enfermedad, en camarones es altamente patogénico y virulento (Karunasagar *et al.*, 1997, Chou *et al.*, 1998, Supamattaya *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1998, Rajan *et al.*, 2000). Los altos niveles de tolerancia que presentan cangrejos y langostas pueden deberse a procesos adaptativos a WSSV o a patógenos virales similares. La evolución de la virulencia es en el fondo un proceso co-evolutivo (Ganusov *et al.* 2002). La avirulencia puede ser un rasgo característico de infecciones persistentes que han coevolucionado por millones de años con sus "hospederos naturales". La transferencia de un virus a otras especies puede ser catastrófica. Ejemplo de esto es el herpesvirus B que causa poco daño en macacos pero induce una encefalitis letal en humanos (Weiss, 2002). Posiblemente este es el caso del WSSV, que probablemente pasó de sus "hospederos naturales" (ej. cangrejos) a otras especies (camarones) donde ha sido altamente virulento

## 7.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La infección con WSSV fue detectada por PCR a partir del primer y segundo día post-infección vía inyección intramuscular y por ingestión de tejido infectado respectivamente. En todos los experimentos se observó este patrón, excepto en el experimento 2 de infección oral. Los resultados obtenidos por la ruta de inyección coinciden con los de Sahul Hameed *et al.* (1998, 2000), pero difieren de los observados en la infección por ingestión. Ya que ellos detectaron infección a partir del 4º día post-infección, esto se debe quizás a que sólo suministraron 3 veces tejido infectado con WSSV como alimento en un intervalo de 8 horas, mientras que en el presente estudio se mantuvo la alimentación 2 veces al día durante 4 días, el contacto constante de los organismos con tejido

infectado tanto por ingesta como por los restos de tejido en el agua de los acuarios, pudo favorecer la infección.

Los resultados de los análisis de PCR, indican una mayor sensibilidad con el sistema WS1R1F que con el sistema IQ2000. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por López-Félix (2002) en una evaluación que realizó de los protocolos de PCR anidados y no anidados. El sistema IQ2000 amplifica un fragmento de 296 pb y el sistema WS1R1F amplifica un fragmento de 200 pb. Lo anterior parece indicar que cuando prevalece una baja carga viral existe una mayor posibilidad de obtener resultados positivos con fragmentos de amplificación pequeños (Hossain *et al.*, 2001).

### 7.3. Histología.

A pesar, que en los experimentos de infección se detectaron por PCR infecciones con WSSV a partir del primer y segundo día post-infección, solo se observaron 5 organismos que exhibieron los c.i., los cuales se observaron a partir del sexto día post-infección por medio de la técnica histopatológica. Esto posiblemente se debió a los bajos niveles de infección obtenidos durante el desarrollo de los experimentos. Los c.i. se observaron en tejidos principalmente de origen ectodérmico (epitelios de la cutícula, branquias, estómago, entre otros) mesodérmico (glándula antenal, corazón, tejido hematopoyético, órgano linfoide, entre otros) coincidiendo con los reportes descritos por Lo *et al.* (1997), Kasornchandra *et al.* (1998) y Wang *et al.* (1999).

En todas las preparaciones histológicas procedentes de los experimentos, se observaron signos de infección, entre las principales lesiones histopatológicas en tejidos que no exhibieron los c.i. característicos de WSSV se encontraron: infiltración hemocítica, hipertrofia nuclear, necrosis celular, formación de esferoides ectópicos y melanización, lo cual sugiere, que fue

estimulada una respuesta de protección de los organismos infectados. Lo anterior se sustenta, en uno de los mecanismos de defensa reconocidos en invertebrados, que es la activación del sistema profenoloxidasa (proPO). Esta es una cascada de enzimas y proteínas localizadas en hemocitos granulares y semigranulares de decápodos que son activados por señales de carbohidratos que constituyen las paredes celulares microbianas, a través de moléculas de adhesión celular. Su activación resulta en la generación de un número de potentes productos bioactivos los cuales asisten en la fagocitosis, la aglutinación y la formación de depósitos de melanina (Smith *et al.* 2003).

Por otro lado, las peroxinectinas, peneidinas y lectinas son las principales moléculas de adhesión celular en camarones, involucradas en el reconocimiento de agentes infecciosos a través de los hemocitos y granulocitos los cuales son capaces de fagocitar, encapsular y formar nódulos (Söderhäll and Cerenius, 1992; Wu *et al.* 2002; Smith *et al.* 2003). Esto también pudo jugar un papel muy importante en la resistencia a WSSV observada en los organismos experimentales.

#### 7.4. Hibridación *in situ*.

Dentro de las pruebas de diagnóstico utilizadas para la detección de enfermedades en camarones, hibridación *in situ* es una de las que presenta mayor especificidad. Esta técnica fue utilizada para corroborar que los cuerpos de inclusión, con los que fue alimentado el sistema digital de correlación a color, correspondieron efectivamente a cuerpos de inclusión de WSSV.

La sonda fue elaborada en los laboratorios de Virología y Biología Molecular en el CIAD Mazatlán. El fragmento de 200 pb de ADN viral obtenido a partir de un fragmento de 737 pb clonado en un vector plasmídico, fue utilizado

como sonda específica para detectar ADN viral de WSSV. La ausencia de cualquier precipitado en tejidos de camarón no infectados con WSSV indica su especificidad. La técnica de hibridación *in situ* proporcionó la localización exacta del ADN viral presente en las secciones de tejido, estos resultados concuerdan con lo reportado por Chang *et al.* 1999. Se observaron reacciones positivas principalmente en branquias, epitelio cuticular, epitelio del estómago, tejido conectivo y glándula antenal, estos resultados coinciden con los obtenidos por Nunan y Lightner (1997).

#### 7.5. Reconocimientos de los cuerpos de inclusión (c.i.) de WSSV por correlación a color.

En los trabajos realizados por el grupo de la Universidad Autónoma de Barcelona (Millán, *et al.* 1989,1992; Kober *et al.* 1997) el algoritmo de reconocimiento de un objeto de color se realiza mediante la suma aritmética de los máximos en cada canal. Es decir que se considera identificado un objeto cuando los máximos valores de correlación coinciden en los tres canales.

Si bien, el algoritmo propuesto para este trabajo presenta algunas similitudes con algoritmos presentados en trabajos anteriores (Álvarez-Borrego y Chávez-Sánchez 2001; Álvarez-Borrego, *et al.* 2002; Fájér-Ávila y Álvarez-Borrego 2002), la diferencia estriba en que la correlación a color se realiza con filtros compuestos solo de fase. Es decir, el algoritmo desarrollado en este trabajo es invariante a escala, rotación y posición, debido a que la información es obtenida de cada uno de los filtros (banco de imágenes de las diferentes formas y colores de los c.i.). Puesto que, los c.i se encuentran embebidos en los tejidos infectados con WSSV y no se presentan de manera aislada. Basándose en esta evidencia, el algoritmo de decisión sobre la presencia de WSSV se hizo en base a la ubicación de los picos de correlación.

Los sistemas de reconocimiento automatizados para la identificación y clasificación de organismos microscópicos, a diferencia de los expertos encargados de realizar estas tareas, no son afectados por factores fisiológicos como: 1) Una memoria limitada; los humanos solo pueden almacenar información entre 5 y 9 detalles; 2) Fatiga y saturación (hastío); y 3) Sesgo positivista, por lo cual la clasificación de un espécimen es influenciado por una misma expectativa de la variedad de especies presentes en una muestra (Evans 1987). Estos sesgos afectan la calidad de los análisis. Sin embargo, los sistemas automatizados pueden perder calidad de reconocimiento, debido principalmente al funcionamiento de los algoritmos de procesamiento seleccionados en presencia de ruido y la natural variabilidad morfológica de los organismos (Culverhouse *et al.* 2003).

La base de datos con que se alimentó el sistema se elaboró en base a las variantes morfológicas y de coloración que presentaron los c.i. de WSSV. Para ello se revisaron 300 láminas histológicas y se hicieron 5 clasificaciones. Sin embargo, aún dentro de esta clasificación los c.i. muestran variabilidad tanto en color como en forma. Estos resultados difieren de las observaciones realizadas por Wang *et al.* (1999), quienes describieron 4 fases de desarrollo de los c.i.

Los valores de sensibilidad y especificidad que se obtuvieron con el programa de correlación a color fueron de 86% y 2.7% respectivamente. Sin embargo, cabe señalar que debido a las características particulares de cada uno de los tejidos observados (coloración, estructura, tipo de células, etc.), es necesario obtener los valores de especificidad para cada tejido y de esta manera obtener un valor más representativo.

Si bien es cierto que existen trabajos de categorización de organismos utilizando taxonomía convencional, donde el personal entrenado obtiene entre 67 y 83% de consistencia (Culverhouse *et al.* 2003), los valores de especificidad observados fueron bajos. Para que un método de diagnóstico sea apropiado es necesario un método con resultados realmente específicos. Una regla general en métodos de diagnóstico en casos de ausencia de enfermedad y para efectos de vigilancia en poblaciones, es una sensibilidad de al menos 95% y una especificidad del 75% y en presencia de enfermedades es necesario un método de diagnóstico con al menos 75% de sensibilidad y con 95% de especificidad (Pfeiffer, 1998).

En los tejidos donde se observó un mayor reconocimiento (100%) fue en tejido nervioso y glándulas del tegumento, mientras que en los tejidos donde el sistema presentó un menor reconocimiento fue en epitelio del estómago y en corazón (78.4 y 69% respectivamente). Por otro lado, los intervalos de confianza obtenidos (Tabla 8), indican un rango de variación más estrecho en aquellos tejidos donde se observó un mayor reconocimiento de c.i., que en donde se observó un menor reconocimiento. En tejido hematopoyético y en órgano linfóide se observó la mayor cantidad de falsos positivos, denotando un bajo poder de discriminación del sistema. Lo anterior, debido posiblemente a la naturaleza de los tejidos; en órgano linfóide existe una gran cantidad de hemocitos y en el tejido hematopoyético es donde éstos son producidos, esta característica les confiere a ambos una coloración predominantemente basófila. La información de color con que fue alimentado el sistema básicamente es basofílica y eosinofílica, es por ello, que incluso células sanas presentes en estos tejidos también fueron reconocidas como c.i. por el sistema de correlación. Por lo que se observó en los resultados que la información determinante para el reconocimiento de los c.i. fue el color más que la forma.

Otros factores que pudieron afectar la sensibilidad y especificidad del sistema son algunos problemas que se tuvieron durante la digitalización de las imágenes como son enfoque e iluminación, debido a la pobre calidad de la cámara digital con que se tomaron las imágenes.

Como se pueden observar en las figuras 30, 31, 32 y 33, el reconocimiento fue más eficiente cuando en las imágenes se presentaban hasta 4 c.i. de WSSV, a medida que estos iban en aumento el poder de discriminación del sistema disminuía debido al ruido de fondo generado por otros elementos presentes en escena. Lo anterior se debió posiblemente a que no se realizó un preprocesamiento de las imágenes (limpieza de las imágenes), además faltó la aplicación de un umbral de reconocimiento en la correlación para omitir ruido en la salida y obtener picos más "limpios" y definidos en las gráficas de reconocimiento

## 8. CONCLUSIONES.

Las ventajas de los sistemas automatizados además de la rapidez de diagnóstico (el tiempo de identificación se estima en segundos), el sistema no sufre de sesgos sistemáticos que afectan a los humanos y por consiguiente la calidad del diagnóstico disminuye. Sin embargo, estos sistemas presentan un problema en particular y es que su funcionamiento depende de que los datos con que es alimentado el sistema sean los correctos.

En el presente estudio el sistema de reconocimiento de los cuerpos de inclusión (c.i.) de WSSV con correlación a color, depende de la naturaleza del tejido en donde se encuentren los c.i. y su poder de discriminación disminuye si se observan más de cuatro c.i. Sin bien, en el presente trabajo la sensibilidad y especificidad del sistema no se encuentra dentro de los estándares que requiere un método de diagnóstico para su validez, es necesario continuar en la búsqueda de nuevos algoritmos que permitan: a) el autoenfoco, b) fusión de las imágenes, c) una mayor definición de las imágenes (bordes de los c.i.), d) centrar mejor la información de los c.i. en las matrices que forman el banco de datos y e) reducir el ruido de fondo generado por otros elementos presentes en las escenas y los problemas de ruido debido a la coloración misma de las tinciones histológicas. Es necesario también, probar otras tinciones (histoquímica), que permitan una mayor diferenciación de los c.i. con el resto de las células presentes en los tejidos. Por otra parte, fue evidente durante el desarrollo de este trabajo la gama de variaciones morfológicas y de color que presentan los c.i. de WSSV, por lo que es necesario ser más estrictos para la construcción de la base de datos con que se alimenta el sistema.

El diagnóstico de enfermedades de camarón, utilizando el sistema de correlación a color, puede ser una herramienta que agilizaría la técnica histológica, la cual es la única que provee un registro permanente de los patógenos *in situ*. Con esta técnica sería posible obtener un diagnóstico en poblaciones donde se observan los síntomas histopatológicos característicos de la enfermedad. Sin embargo, en condiciones sub-clínicas y en organismos portadores no es posible detectarla. Para ello, es necesario contar con métodos de diagnóstico confirmativos como son las técnicas moleculares con las que se pueden reforzar o refutar los resultados obtenidos con la histología, así como con otras técnicas de diagnóstico utilizadas. En general, esto demuestra que ninguna técnica tiene ventajas sobre otra y que ninguna parece tener la suficiente certidumbre para utilizarse sola, sino que la información proporcionada por cada técnica de diagnóstico es complementaria.

En resumen, el sistema de reconocimiento de cuerpos de inclusión de WSSV utilizando correlación a color debe ser perfeccionado; probando nuevos algoritmos que disminuyan el ruido en las imágenes y que realcen los rasgos más característicos de las morfologías de los c.i. de WSSV. Así como también, poner especial atención en el procesamiento de las imágenes; el equipo de digitalización de las imágenes debe contar con un alto nivel de resolución y finalmente ser muy estrictos en la construcción de la base de datos; debido a las variantes morfológicas y de color que presenta WSSV.

## LITERATURA CITADA

- ADB/NACA, 1991.** Fish Health Management in Asia-Pacific. Report on a regional study and Workshop on fish health management. ADB agriculture department report series N° 1 network of aquaculture centers in the Asia Pacific, Bangkok, Thailand.
- Alday-Sanz V. And Flegel T., 1997.** The risk of introducing yellow-head and white-spotviral infections from Asia to the America. CD ROM paper N° 1, IV Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 22-27 Octubre, 1997, Guayaquil, Ecuador, 9 pp.
- Almeida S., 1972.** Holographic microscopy of diatoms. *Trans. Kans. Acad. Sci.*, 74: 257-260.
- Almeida S., 1976.** Water pollution monitoring using matched spatial filters. *Appl. Opt.*, 15: 510-515.
- Almeida S., 1978.** Analysis of algae samples using Coherent optical processing. In Proceedings of ICO-11 Conference. Madrid, Spain, pp. 351-354.
- Álvarez-Borrego J. y Chávez-Sánchez M., 2001.** Detection of IHHN virus in shrimp tissue by digital color correlation. *Aquaculture* 194: 1-9
- Álvarez- Borrego J., Mouriño-Pérez R., Cristóbal-Pérez G., Pech-Pacheco, J., 2002.** Invariant recognition of polychromatic images of *Vibrio cholerae* 01. *Optical Engineering*, 41(4): 827-833. (Publicado) (PROYECTO INTERNO: 6576) (CEOPA20024) (PA)

- Álvarez-Borrego J., Castro-Longoria E., 2003.** Discrimination between *Acartia* (Copepoda:Calanoida) species using their diffraction pattern in a position, rotation invariant digital correlation. *J. Plankton Research*, 25(2): 229-233.
- Asano K. and Tanaka S., 1984.** Measurement of fish eggs with an image processor. *Bull. Fac. Fish., Mie Univ.*, 11: 135-140.
- Bachère E., 2000.** Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191: 3-11.
- Bachère E., Destoumieux D., Bulet, P., 2000.** Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* 191: 71–88.
- Balfoort H., Snock J. Smith J., Breedveld, L., Hofstraat, J. and Ringelberg J., 1992.** Automatic identification of algae: neural network analysis of flow cytometric data. *J. Plankton Res.*, 14 (4): 575-589.
- Baxter K., Rigdon R., Hanna C., 1970.** *Pleistophora sp* (Microsporidian: Nosematidae): a new parasite of shrimp. *J Invertebr. Pathol.* 16: 289-291
- Bjornsen P., 1986.** Automatic determination of bacterio-plankton biomass by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 1199-1204.
- Brandiqué E., Komiya Y., Ohyama N., Tsujiuchi J., Honda T., 1987.** Color image correlation. *Optics. Communications*. 61(3): 181-186.
- Brock J., Lightner D.V., 1990.** Diseases of crustacea. Diseases caused by proliferative lesions and neoplasia. In Kinne, O.(Ed.), *Diseases of Marine Animals, Vol. III*, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 390-400.

- Brown L., Gargantini I., Brown D., Atkinson H., Govindarajan J. and Vanlerberghe G., 1989.** Computer-based image analysis for the automated counting and morphological description of microalgae in culture. *J. Appl. Ecol.*, 211-225.
- Cairns J., 1972.** Coherent optical spatial filter of diatoms in water pollution monitoring. *Arch. Microbiol.*, 83: 141-146.
- Cairns J., 1982.** Automated identification of diatoms. *BioScience*, 32: 98-102.
- Cameron A., 2000.** Survey Toolbox for Aquatic Animal Diseases. A practical manual software package. Aciar monograph N° 94375. Capitulo 4: *Principles of active surveillance*. 61-64.
- Castro-Longoria E., Álvarez-Borrego J., Pech-Pacheco, J., 2001.** Identification of species of calanoid copepods using a new invariant correlation algorithm. *Crustaceana*, 74 (10): 1029-1039.
- Castro-Longoria E., Álvarez-Borrego J., Rocha-Olivarez A., Gómez, S., Kober V., 2003.** The power of a multidisciplinary approach: using morphological, molecular and digital methods in the study of harpacticoid cryptic species. *Marine Ecology*, 249: 297-303.
- Coordingley J., 1993.** Application of a binary diffractive optic for beam shaping in semiconductos processing by lasers. *Appl. Optics.*, 32: 2538-2542.
- Couch J., 1974a.** Free and occluded virus similar to baculovirus in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature* 247, 229.

- Couch J., 1974b.** An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invertebr. Pathol.* 24: 311–331.
- Cristóbal-Pérez G., Forero-Vargas M., Desco M., Alcalá L. Álvarez-Borrego J., 2003.** Automatic identification techniques of tuberculosis bacteria. The international Symposium on Optical Science and Technology, SPIE's 48th Annual Meeting. San Diego, CA, USA. Applications of Digital Image Processing XXVI.
- Culverhouse P., Ellis R., Simpson R., Pierce R., Turner J., 1994.** Categorization de 5 species of *Cymatocylis* (Tintinidae) by artificial neural network. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 107: 273-280.
- Culverhouse P., Simpson R., Ellis R., Lindley J., 1996.** Automatic classification of field-collected dinoflagellates by artificial neural network. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 139: 281-287
- Culverhouse P., Williams R., Reguera B., Herry V., González-Gil S., 2003.** Do experts make mistakes? A comparison of human and machine identification of dinoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 247: 17-25.
- Chang P., Lo C., Wang Y., Kou G., 1996.** Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis Aquat Org* 27: 131–39

- Chang Y., Peng S., Wang H., Hsu H., Ho C., Wang C., Wang S., Lo C., Kou G., 2001.** Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analysis of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (*Callinectes sapidus*) from American coastal waters. *Mar. Biotechnol.* 3: 163-171.
- Chehdi K. and Boucher J., 1986.** Extraction automatique de paramètres descriptifs par l'analyse d'images. Application à la biologie marines (zooplankton). *Innov. Tech. Biol. Maed.*, 7: 386-399.
- Chen S., 1995.** Current status of shrimp aquaculture in Taiwan. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), *Swimming through trouble water. Proceeding of special session on shrimp farming, Aquaculture'95.* World Aquaculture society, Baton Rouge, L. A. USA, pp 29-34.
- Chou H., Huang C., Wang C., Chiang H., Lo C., 1995.** Pathology of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 25: 133-141.
- Chou H., Huang C., Lo F., Kou G., 1998.** Studies of transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture* 164: 263-276.
- Dietrich A. and Uhling G., 1984.** Stage specific classification of copepods with automatic image analysis. *Crustaceana*, 3: 159-165.
- Durand S., Lightner D., Nunan L., Redman R., Mari J., Bonami J., 1996.** Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSSV) of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 27: 59-66.

- Durand S., Lightner D., Redman, R., Bonami, J., 1997.** Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.* 29: 205–211.
- Ebert D. and Hamilton W., 1996.** Sex against virulence: the coevolution of parasitic diseases. *Trends Ecol. Evol.* 11: 79–82.
- Estep K., MacIntyre F., Hjoleifsson E. and Sieburth J., 1986.** MacImage: a user-friendly image –analysis system for the accurate mensuration of marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 33: 243-253.
- Evans J., 1987.** Bias in human reasoning: causes and consequences. Laurence Erlbaum, Hove UK.
- Fajer-Ávila E. y Álvarez-Borrego J., 2002.** Invariant digital color correlation for the identification of Word parasites from bullseye pufferfish. *Spie*, Vol. 4790. *Applications of digital Image Processing XXV*, pp 511-517.
- Farrell P., 1992.** Optical evaluation methods in particle image velocimetry. *Optics and Lasers in Engineering*, 17: 187-207.
- FAO/SMIA, 2001.** Perspectivas Alimentarias. *Boletín de novedades* No. 1, p. 11.
- Fegan D., 2000.** Evaluation of diagnostic tests: the epidemiological approach. FAO Fisheries Technical Paper. No. 395. Rome, FAO. 30pp.
- Ferreira C., Millán M., Yzuel M., Campos J., 1992.** Experimental results in color pattern recognition by multichannel matched filtering. *Optical Engeneering* 31 (10): 2231-2238.

- Flegel T., Fegan D., Sriurairatana S., 1995.** Environmental control of infectious disease in Thailand. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), *Swimming through trouble water. Proceeding of special session on shrimp farming, Aquaculture'95.* World Aquaculture society, Baton Rouge, L. A. USA, pp. 65-79.
- Flegel T., 1997.** Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 433-442
- Flegel T., Alday-Sánchez, V., 1998.** The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. *J. Appl. Ichthyol.* 14: 269-273.
- Forero-Vargas M., Sierra-Ballén E., Álvarez-Borrego J., Pech-Pacheco J., Cristóbal G., Alcalá L., Desco M., 2001.** Automatic sputum color image segmentation for tuberculosis diagnosis. *SPIE*, 4471-27: 251-261.
- Forero-Vargas M., Sroubek F., Alvarez-Borrego J., Malpica N., Cristóbal-Perez G., Santos A., Alcalá L., Desco M., Cohen L., 2002.** Segmentation, autofocusing and signatura extraction of tuberculosis sputum images. *The International Symposium on optical Science and Technology, Seattle, Washington.* 4788: 171-182. SPIE-The International Society for Optical Engineering.
- Francki R., Fauquet C., Knudson D., Brown F., 1991.** Classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 12: 1-450.
- Fuji H. and Almeida S., 1979a.** Partially matched spatial filtering with simulated input. *SPIE*, 177: 122-127 *Optical Information Storage.*

- Fuji H. and Almeida S., 1979b.** Coherent spatial filtering with simulated *input*. *Appl. Opt.*, 18: 1659-1662.
- Fuji H., Almeida S., and Dowling J., 1980.** Rotacional matched spatial filter for biological pattern recognition. *Appl. Opt.*, 19: 1190-1193.
- Furuya K., 1981.** Studies in phytoplankton communities in subsurface chlorophyll maxima. Doctoral Dissertation, Univ. Tokyo, 235 pp.
- Furuya K., 1982.** Measurement of phytoplankton standing stock using an image analyzer system. *Bull. Plankton Soc. Japan*, 29: 133-135.
- Ganusov V., Bergstrom C. and Antia R., 2002.** Within-host population dynamics and the evolution of microparasites in a heterogeneous host population. *Evolution*, 56(2): 213-223.
- Georgiadis M., Gardner I., Hedrick R., 2001.** The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious disease of fish. *Preventive Veterinary Medicine* 48: 287-302.
- Gorsky G., Guilbert P. and Valenta E., 1989.** The autonomus image analyzer- enumeration, measurement and identification of marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 58: 133-142.
- Hasson K., Lightner D., Poulos B., Redman R., White B., Brock J., Bonami J., 1995.** Taura Syndrome in *Penaeus Vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.* 23: 115-126.
- Horne, J. And Gianino, P., 1984.** Phase-only matched filtering. *Applied Optics*, 23 (6): 812-816.

- Hossain S., Chakraborty A., Joseph B., Otta S., Karunasagar I., Karunasagar I., 2001.** Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture* 198: 1-11.
- Huang, J., Song, X.L., Yu, J., Yang, C.H., 1995.** Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis, study on the pathogen and pathology of the shrimp explosive epidemic disease of shrimp. *Mar. Fish. Res.* 16: 1-10.
- Ingram M. and Preston K. Jr., 1970.** Automated image analysis of blood cells. *Sci. Am.*, 223: 72-82.
- Inouye K., Miwa S., Oseko N., Nakano H., Kimura T., Momoyama K., Hiraoka M., 1994.** Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish. Pathol.* 29: 149-158.
- Inouye, K., Yamamo, K., Ikeda, N., Kimura, T., Momoyama, K., Kobayashi, J., Miyajima, S., 1996.** The penaeid rodshaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.* 31: 39-45.
- Jeffries H., Sherman K., Maurer R. and Katsinis C., 1980** Computer processing of zooplankton samples. In: Kennedy, V. (ed.) Estuarine perspectives. *Academic Press*, New York, pp. 303-316.
- Jeffries H., Berman M., Poularikas A., Katsinis C., Melas I., Sherman K. and Bivins L., 1984.** Automatic sizing, counting and identification of zooplankton by pattern recognition. *Mar. Biol.*, 78: 329-334.

- Kanchanaphum P., Wongteerasupaya C., Sitidilokratana N., Boonsaeng V., Panyim S., Tassanakajon A., Withyachumnarnkul B., Flegel T., 1998.** Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 34: 1-7.
- Karunasagar I., Otta S., Karunasagar I., 1997.** Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture* 153: 9– 13.
- Kasornchandra J., Boonyaratpalin S., Itami T., 1998.** Detection of white-spot syndrome in culture penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164: 243-251.
- Kim C., Kim P., Sohn S., Sim D., Sim D., Park M., Heo M., Lee T., Lee J., Jun H., Jang K., 1998.** Development of polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp. *J. Fish. Dis.* 21: 11-17.
- Kimura T., Yamano K., Nakano H., Momoyama K., Hiraoka M., Inouye K., 1996.** Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish. Pathol.* 31: 93-98.
- Kover V., Lashn V., Moreno I., and Campos J., 1997.** Color component transformations for optical pattern recognition. *J. Opt. Soc. Am.* 14: 2656-2669.
- Leger R. and Morris M., 1993.** Diffractive optics: an introduction to the feature. *Appl. Optics*, 32: 2481-2482.
- Lightner D., Lewis D., 1975.** A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Marine Fish. Rev.* 37: 25-28.

- Lightner D., Redman R., Bell T., 1983.** Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.* 42: 62-70.
- Lightner D., 1988.** Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. In: Sinderman, C.J., Lightner, D.V., (Eds.) *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 8-127.
- Lightner D., 1993.** Diseases of penaeid shrimp. In: McVey, J.P. (Ed.) *CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture*, 2<sup>nd</sup> edn. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 393-486.
- Lightner D., (Ed.) 1996.** A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, USA, 305 pp.
- Lightner D., Redman R., Poulus B., Nunan L., Mari J., Hasson K., 1997.** Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live shrimp for aquaculture and frozen shrimp for commodity markets. *Revue Scientifique et technique Office International des Epizooties* 16: 146-160.
- Lightner D., and Redman R., 1998.** Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201-220.
- López-Félix S., 2002.** Determinación y evaluación por PCR, la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), en unidades de producción camaronícola del estado de Sinaloa. Tesis de Maestría en Ciencias. CIAD Mazatlán. 68pp

- Lotz, J., 1997.** Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13 (4): 405-413.
- Lotz J. and Soto A.M., 2002.** Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquatic. Org.* 50: 199-2002.
- Maeda M., Itami T., Kondo M., Henning O., Takahashi Y., Hirono I., Aoki T., 1997.** Characteristics of penaeid rod-shaped DNA virus of Kurama shrimp. In: Inui Y (ed) New approaches to viral diseases of aquatic animals. NRIA International Workshop. Kyoto, Japan, National Research Institute of Aquaculture, Nasei, p. 218-228.
- Max Born and Emil Wolf., 1980.** Principles of optics electromagnetic theory of propagation interference and diffraction of light. Capitulo VIII. *Elements of Theory of Diffraction.* Sixth edition, Pag. 370.
- Millán M., Campos J., Ferreira C., Yzuel M. J., 1989.** Matched filter and phase only filter performance in colour image recognition. *Opt. Commun.* 73 (4): 277-284.
- Millán M., Yzuel M., Campos J., Ferreira C., 1992.** Different strategies in optical recognition of polychromatic images. *Appl. Opt.* 31 (14): 2560-2567.
- Murphy F., Fauquet C., Bishop D., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G., Mayo M., Summers M., 1995.** Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. *The Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Springer-Verlag, Vienna.

- Mouriño-Pérez R., 1999.** Correlación a color para la identificación de diferentes estadios de *Vibrio cholerae* 01. *Tesis Doctoral*. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada.
- Nadala E., Tapay L., Cao S., and Loh P., 1997.** Detection of yellow-head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the western blot technique. *J. Virol. Methods* 69: 39-44.
- Negrete-Regagnon P. and Álvarez-Borrego, J., 1990.** Optical and digital image processing of a simulated sea surface. *Optica Pura y Aplicada*, 23: 7-27.
- Nunan L., and Lightner D., 1997.** Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods* 63: 193-201.
- Overstreet R., Stuck K., Krol R., Hawkins W., 1988.** Experimental infection in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) as a bioassay. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 19(4): 122-130.
- Overstreet R., Lightner D., Hasson K., Mcilwain and Lotz J., 1997.** Susceptibility to Taura syndrome virus of some penaeid shrimp species native to the gulf of México and the Southeastern United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 69: 165-176.
- Pech-Pacheco J., Álvarez-Borrego J., 1998.** Optical-digital system applied to the identification of five phytoplakton species. *J. Marine Biology*, 132(3): 357-366.

- Pech-Pacheco J., Álvarez-Borrego J., Orellana-Cepeda E. and Cortés-Altamirano R., 1999.** Diffraction patterns applicability in identification of *Ceratium species*. *J. Plankton Research*.
- Pech-Pacheco J., Cristóbal-Pérez G., Álvarez-Borrego J., Cohen L., 2000.** Power cepstral image analysis through the scala transform. Algorithms and system for optical information processing IV Bahram Javidi, Demetri Psaltis, Editors, *Proceedings of SPIE*, Vol. 4113.
- Pech-Pacheco J. and Álvarez-Borrego J., 2001a.** Identification of a red tide blooming species through an automatic optical-digital system. *SPIE*, The International Society for Optical Engineering, 4471: 243-250.
- Pech-Pacheco J. L., Cristóbal G., Álvarez-Borrego J. and Cohen, L., 2001b.** Automatic system for phytoplanktonic algae identification. *Limnética* 20 (1): 143-158.
- Pech-Pacheco J., Álvarez-Borrego J., Cristóbal G., Keil M., 2003.** Automatic object identification irrespective of geometric changes. *Opt. Eng.* 42(2): 551-559.
- Pernick B., Kopp R., Lisa J., Mendelsohn J, Stone H. Wohlers R., 1978.** Screening of cervical cytological samples using coherent optical processing. Part 3. *Applied Optics* 17 (1): 43-51
- Pettipher G. and Rodriguez U., 1982.** Semi-automated counting of bacteria and somatic cells in milk using epifluorescence microscopy and television image analysis. *J. Appl. Bact.*, 53: 323-329.

- Pfeiffer D., 1998.** Veterinary Epidemiology. An Introduction. Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences, Massey University, Palmerston, New Zealand.
- Poulus B., Pantoja C., Bradley-Dunlop D., Aguilar J., Lightner D., 2001.** Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Organ.* 47(1): 13-23.
- Prewitt J. M. S. and Mendelsohn M., 1966.** The analysis of cell images. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 128: 1035-1053.
- Rajan P., Ramasamy P., Purushothama V., Brennan G., 2000.** White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* and *P. indicus*. *Aquaculture* 184: 31–44.
- Rodier C. and Rodier F., 1987.** Interferogram analysis of cell images. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 97: 482-490.
- Rodriguez-Santiago M., 2002.** Identificación de especies ectoparásitas del género *Trichodina* –Cilophora:Peritrichida- en *Tilapia nilotica* mediante correlación invariante con filtros compuestos. *Tesis de Maestría*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán.
- Rolke M. and Lenz J., 1984.** Size structure analysis of zooplankton samples by means of an automated image analyzing system. *J. Plankton Res.*, 6: 637-645.
- Rosenberry B., 1996.** "World Shrimp Farming 1996". *Shrimp News International*, San Diego, CA, pp. 29-30

- Rosenberry B., 2000.** "World Shrimp Farming 2000". *Shrimp News International*, San Diego, CA.
- Sahul Hameed A., Anilkumar M., Stephen Raj M., Jayaraman K., 1998.** Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture* 160: 31–45.
- Sahul Hameed A., Xavier C., Anilkumar M., 2000.** Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183: 207–213.
- Sieracki M. E., Johnson P. W. and Sieburth J., 1985.** Detection enumeration and sizing of planktonic bacteria by image-analyzed epifluorescence microscopy. *Appl. Environ Microbiol.*, 49: 799-810.
- Simpson R., Williams R., Ellis R. and Culverhouse P., 1992.** Biological pattern recognition by neural networks. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 79: 303-308.
- Smith V., Brown H., Hauton C., 2003.** Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish & Shellfish immunology* 15: 71-90.
- Snieszko S., 1973.** Diseases of fishes and their control in the U.S. In: The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report. Jansen, London, pp. 55-66.
- Söderhäll K., Cerenius L., 1992.** Crustacean immunity. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2: 3–23.
- Soto M., Shervette V., Lotz J., 2001.** Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalothorax, abdomen, or whole shrimp cadaver. *Dis. Aquat. Org.* 45: 81-87.

- Soto A., and Lotz J., 2002.** Epidemiological parameters of white spot syndrome virus infection in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 9-15.
- Sudha P., Mohan C., Shankar K., Hegde A., 1998.** Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture* 167: 95-101.
- Suppamattaya K., Hoffman R., Boonyaratpalin S., Kanchanaphum P., 1998.** Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Dis. Aquat. Org.* 32: 79-85.
- Takahashi Y., Itami T., Kondo M., Maeda M., Fuji R., Tomanaga S., Supamattaya K., Boonyaratpalin S., 1994.** Electron microscopic evidence of bacillariform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Gyobo Kenkyu. Fish. Pathol.* 29: 121-125.
- Takahashi Y., Itami T., Maeda M., Suzuki N., Kasornchandra J., Supamattaya K., Khongpradit R., Boonyaratpalin S., Kondo M., Kawai K., Kusuda R., Hirono I. And Aoki T., 1996.** Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacillariform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *J. Fish. Dis.* 19: 399-403.

- Trusfield M., 1995.** Veterinary Epidemiology 2<sup>nd</sup> Edition. *Publ. Blackwell Science LTD., Oxford, UK.*
- Tsuji T. and Nishikawa T., 1984** Automated identification of red tide phytoplankton *Prorocentrum triestinum* in coastal areas by image analysis. *J. Oceanogr. Soc, Japan*, 40: 425-431.
- Uhlmann D., Schlimpert O. and Uhlmann W., 1978.** Automated phytoplankton analysis by a pattern recognition method. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, 63: 575-583.
- Villalobos-Flores C., Álvarez-Borrego J., Pech-Pacheco J., Cristóba G., Castro-Longoria E., 2001.** 4th Iberoamerican Meeting on Optics and 7th latin American Meeting on Optics. *Laser and their Applications*. Vol. 4419: 18-21.
- Villalobos-Flores E., Álvarez-Borrego J., Kober V., Cristóbal-Pérez G., Castro-Longoria E., 2002.** Study of 21 fragmented fossil diatoms using a digital invariant correlation. The International Symposium on Optical Science and Technology. Seattle, Washington. 4790: 528-533. *SPIE-The International Society for Optical Engineering.*
- Vander Lugt A., 1964.** Signal detection by complex spatial filtering, *IEEE Trans. Inf. Theory* , 10: 139-145.
- van Hulten M., Tsai M., Schipper C., Lo C., Kou G. and Vlak J., 2000a.** Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *Journal of General Virology* 81: 307–316.

- van Hulten M., Goldbach R. W. and Vlak J., 2000b.** Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *Journal of General Virology* 81: 2525–2529.
- van Hulten M., Witteveldt j., Peters S., Kloosterboer N. and 5 others., 2001.** The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7-22.
- Vlak M., Bonami J. R., Flegel T., Kou G., Lightner D., Lo C., Loh C., Walter P., 2002.** Nimaviridae. A new virus family infecting aquatic invertebrates. *XIIIth International Congress of virology*. Paris, France.
- Wang C., Lo C., Leu J., Chou C., Yeh P., Chou H., Tung M., Chang C. Su M. And Kou G., 1995.** Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 23: 239-242.
- Wang C., Tsai Y., Kou G., Chen S., 1997.** Detection of white spot disease virus infection of wild-caught greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis* (de Haan) in Taiwan. *Fish Pathol.* 32: 35-41.
- Wang Y., Lo C., Chang P., Kou G., 1998.** Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164: 221-231.
- Wang Q., White B., Redman R., Lightner D., 1999.** Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 170: 179-194.

- Wang Y., Hassan M., Shariff M., Zamri S., Chen X., 1999.** Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Dis. Aquat. Organ.* 39(1): 1-11.
- Weiss R., 2002.** Virulence and Patogénesis. *TRENDS in Microbiology* 10(7): 314-317.
- Wongteerasupaya C., Wongwisansri, S., Boonseang, V., Panyim, S. Pratanpipat, P., Nash, G.L., Whithayachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1996.** DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infectin in six penaeid shrimp species. *Aquaculture* 143: 23-32.
- Wu JL, Nishioka T, Mori K, Nishizawa T, Muroga K., 2002.** A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 13(5): 391-403.
- Yoganandhan K., Sathish S., Murugan V. , Narayanan R., Sahul Hameed S., 2003.** Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. *Aquaculture* 215: 21-29.
- Yu F., Chao T., 1983** Color signal correlation detection by matched spatial filtering. *Appl. Phys. B: Photophys. Laser Chem.* B 32 (1).
- Zavala-Hamz V., Álvarez-Borrego J., Trujillo-Ortiz A., 1996.** Diffraction patterns as a tool to recognize copepods. *J. Plankton Research.* 18 (8): 1471-1484.

**Zavala-Hamz V. and Alvarez-Borrego J., 1997.** Circular harmonic filters for the recognition of marine microorganisms. *Appl. Optics*. 36 (2): 484-489.

## APÉNDICE A

### **Lisis alcalina del Kit IQ2000**

1. Lisis. Añadir 500 l de buffer de lisis (Lysis buffer, Cat. AG9000-200, Farming Intelligene Tech Corp.). Homogeneizar el tejido en forma manual con unos maceradores de plástico estériles hasta quedar de manera uniforme.
2. Desnaturalizar e inactivar las proteínas en un termoblock modelo Lab-line a una temperatura de 95°C por 10 minutos.
3. Centrifugar por 10 minutos a 12, 000 rpm, para separar el ADN de las proteínas y restos celulares.
4. Precipitar el ADN. Añadir 400 l de etanol al 96° frío para precipitar el ADN. Tomar 200 l del sobrenadante con una punta con filtro y añadir al tubo con etanol, agitar ligeramente, centrifugar por 5 minutos a 12, 000 rpm.
5. Secar el pellet a temperatura ambiente invirtiendo el tubo sobre un papel absorbente.
6. Resuspensión del ADN: Dependiendo del tamaño del pellet, añadir de 200 a 400 l de agua estéril. El ADN extraído se almacenó a 20°C.

## APÉNDICE B

Para evitar cualquier tipo de contaminación, durante la preparación de las mezclas de las reacciones de PCR, el área destinada para este fin, fue limpiada con etanol al 70% cada vez que se preparó una reacción y para la manipulación del material y los reactivos, se utilizaron guantes de látex (Ambiderm nitrilo, Malasia). Finalmente, se incluyó un control positivo y para garantizar que no existió ningún tipo de contaminación durante la preparación de las mezclas, se utilizó un control negativo. El control negativo fue la mezcla maestra sin ADN de las muestras a analizar.

Los reactivos requeridos para preparar las mezclas de la primera y segunda reacción/anidada para PCR, estuvieron en función del número de muestras. Los volúmenes descritos en la tabla 2, son para preparar una muestra única.

Tabla 4.- Preparación de mezcla maestra del Kit IQ2000, para la primera y segunda reacción de PCR.

Reactivos	Cantidad/muestra
Primera Reacción:	
✓ PreMix (buffer, dNTPs, y primer específicos para WSSV )	7.5 µl
✓ Taq ADN polimerasa (2U/µl)	0.5 µl
Segunda reacción:	
✓ PreMix (buffer, dNTPs, y primer específicos para WSSV )	14 µl
✓ IQzyme DNA polimerasa (IQ2000) (2U/µl)	1 µl

1). En un tubo estéril de 0.2 ml previamente etiquetado, se mezclaron 8 µl de la primera Premix, y 2 µl de ADN, los tubos se colocaron en el termociclador previamente programado (Tabla 3).

2). La reacción anidada (segunda reacción) se preparó adicionando a los tubos de 0.2 ml conteniendo el producto de la primera reacción, 14 µl de PreMix anidada, y 2 µl de IQzyme. Los tubos fueron colocados nuevamente en el termociclador previamente programado.

Tabla 5 -Condiciones del termociclador (ThermoHybaid, SPRT001 ISSUE2, UK) -

1era. Reacción:	Temperatura(°C)	Tiempo(segundos)	Número de ciclos:
Desnaturalización	94	30	5
Alineación	62	30	
Extensión	72	30	
Desnaturalización	94	15	11
Alineamiento	62	15	
Extensión	72	20	
Extensión final	72	∞	1
2da. Reacción:			
Desnaturalización	94	20	25
Alineación	62	20	
Extensión	72	30	
Extensión Final	72	30	1
	4	∞	

Después que la reacción anidada fue completada, se agregaron 5 µl de buffer de carga. Finalmente, la reacción se visualizó corriendo una electroforesis a 90 Volts, durante 20 minutos en gel de agarosa al 2%.

APÉNDICE C

Tabla 6. - Preparación de mezcla maestra para el sistema WS1F/1R.

Reactivos	Concentración	Cantidad/muestra
✓ H2O estéril		8.48 $\mu$ l
✓ Buffer PCR	10X	1.25 $\mu$ l
✓ IQzyme DNA polimerasa	2U/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l
✓ dNTPs	2.5 mM	0.66 $\mu$ l
✓ MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0.75 $\mu$ l
✓ Primer (F)	0.25 $\mu$ g· $\mu$ l <sup>-1</sup>	0.13 $\mu$ l
✓ Primer (R)	0.25 $\mu$ g· $\mu$ l <sup>-1</sup>	0.13 $\mu$ l

Una vez preparada la mezcla maestra, se siguió el mismo procedimiento que para las muestras con IQ2000. Las condiciones del termociclador para las reacciones de PCR con el sistema WS1F/1R, se describen en la Tabla 5.

Tabla 7.-Condiciones del termociclador (ThermoHybaid, SPRT001 ISSUE2, UK) -

1era. Reacción:	Temperatura(°C)	Tiempo	Número de ciclos:
Desnaturalización	95	3 min	5
Desnaturalización	94	30 seg	35
Alineamiento	55	45 seg	
Extensión	72	45 seg	
Extensión Final	72	7 min	1
	4	∞	

El producto de la reacción se visualizó corriendo una electroforesis a 90 Volts, durante 20 minutos en gel de agarosa al 2%.

## APÉNDICE D

### Tinción Hematoxilina-Eosin-Floxina

2 inmersiones en xileno por 5 minutos cada uno

10 enjuagues en etanol absoluto, 2 veces

10 enjuagues en etanol al 95%, 2 veces

10 enjuagues en etanol 80%, 2 veces

10 enjuagues en etanol al 50%, 1 vez

6 enjuagues en agua destilada, 1 vez

Una vez hidratados los tejidos, las láminas fueron teñidas con el colorante vital hematoxilina de Mayer por un tiempo de 10 minutos. Se hizo un lavado con agua corriente para eliminar el exceso de colorante en las láminas por 4 minutos y enseguida de pasaron al colorante eosin-floxina por 2 minutos.

Los tejidos teñidos fueron deshidratados de la siguiente manera:

10 enjuagues en etanol al 96%, 2 veces.

10 enjuagues en etanol absoluto, 2 veces

10 enjuagues en xileno, 4 veces

## APÉNDICE E

### PURIFICACIÓN DE BANDA

Se utilizó el sistema WS1F1R para llevar a cabo la amplificación del plásmido de WSSV, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. El producto de 200 pb fue visualizado corriendo un gel de agarosa al 1% durante 25 minutos a 90 volts (Figura 6). Posteriormente, el gel fue colocado en un transiluminador (Ultra Lum, model EA-40, USA) para facilitar la visualización de la banda a purificar (Kit Promega, USA), la cual fue cortada utilizando una navaja estéril y colocada en un tubo estéril previamente pesado, se obtuvo la diferencia pesando nuevamente el tubo, el valor obtenido equivale a un volumen. Posteriormente, se agregó 1 volumen de "membrane binding solution".

se incubó a 50°C por 10 minutos haciendo vortex hasta disolver el gel. La muestra fue transferida a una columna e incubada a temperatura ambiente por un minuto, para luego ser centrifugada a 13,000 rpm, utilizando una centrífuga (Eppendorf, modelo 5415 D, Germany) durante un minuto, el líquido filtrado fue eliminado y se añadió 700 µl de "membrane wash solution", la muestra se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm y se eliminó nuevamente el filtrado. En seguida, se agregaron de 500 µl "membrane wash solution" y se centrifugó por 5 minutos a máxima velocidad. La columna fue transferida a un tubo estéril de 1.5 ml, se añadieron 50 µl de agua libre de nucleasas, se incubó durante un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. El producto (ADN purificado) fue almacenado a -20°C, hasta su posterior marcaje.

Tabla 8.- Preparación de la mezcla maestra para la obtención de la banda del plásmido de WSSV.

Reactivos	Concentración	Cantidad (5x+ 1x por pérdidas en el pipeteo)
Agua estéril		50.88 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	25mM	4.5 $\mu$ l
dNTP's	2.5 mM	3.96 $\mu$ l
Buffer PCR	10X	7.5 $\mu$ l
Primer Forward	250 $\mu$ g·ml <sup>-1</sup>	0.78 $\mu$ l
Primer Reverse	250 $\mu$ g·ml <sup>-1</sup>	0.78 $\mu$ l
IQzyme DNA polimerasa	2U/ $\mu$ l	1.2 $\mu$ l

## APÉNDICE F

Para el marcaje de la sonda se utilizó el kit de Roche N° 093657(USA).

- 1) En un tubo de plástico estéril, se colocaron 10 $\mu$ l del ADN purificado.
- 2) Se agregaron 20 $\mu$ l de agua destilada y se incubó a 100°C por 10 minutos.
- 3) Inmediatamente después, el tubo se colocó en hielo y se mantuvo en él hasta agregar 4 $\mu$ l de "hexanucleotidoemix" (vial 5), 4 $\mu$ l de "dNTP's labeling mix ", y 2  $\mu$ l de "klenow enzime labeling grade" (vial 7).
- 4) La reacción se mezcló bien con una pipeta estéril y posteriormente fue incubada toda la noche a 37°C en baño maría.
- 5) Para detener la reacción se agregaron 2  $\mu$ l de EDTA 0.2 M (pH). Finalmente la sonda marcada fue almacenada a -20°C para su posterior uso.

## APÉNDICE G

Las laminillas fueron desparafinadas y secadas durante 1 hora en un horno (Felisa México) a 60°C e hidratadas como se describe a continuación:

- 1 inmersión con xilol 1 durante 5 minutos
- 1 inmersión con xilol 2 durante 5 minutos
- 1 inmersión en alcohol 100% 1 durante 1 minutos
- 1 inmersión en alcohol 100% 2 durante 1 minutos
- 1 inmersión en alcohol 96% 1 durante 1 minutos
- 1 inmersión en alcohol 96% 2 durante 1 minutos
- 1 inmersión en alcohol 80% 1 durante 1 minutos
- 1 inmersión en alcohol 80% 2 durante 1 minutos
- 1 inmersión en alcohol 50% durante 1 minuto

Posteriormente se enjuagó con agua 5 veces y las laminillas se sumergieron en 1X PBS (Buffer Fosfato-Salino) durante 5 minutos.

Previa eliminación del buffer, fue añadida la proteínasa K ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a cada una de las laminillas y colocadas en una cámara húmeda para su incubación a 42°C durante 15 minutos. Para inactivar la proteínasa las laminillas fueron sumergidas en 1X PBS/Glicina al 0.2% durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Para la post-fijación, las laminillas fueron sumergidas en formaldehído al 0.4% durante 10 minutos a 4°C

Posterior al proceso de post-fijación, Las laminillas fueron escurridas y cubiertas con el buffer de pre-hibridación y colocadas sobre un vaso de precipitado con agua a temperatura de  $53 \pm 3$  °C durante 5 minutos.

Posteriormente, se escurrieron las láminas con esta solución, se colocaron sobre una placa de hielo en donde se añadió la sonda (5µl de sonda en 100 µl de soln. de hibridación/ laminilla), se cubrieron con parafilm (American Nacional Can<sup>TM</sup>, USA) evitando formar burbujas y se colocaron en cámara húmeda. Se incubaron a 42°C toda la noche.

Pasado el tiempo de incubación, el proceso de post-hibridación y detección de la sonda se realizó de la siguiente manera:

- 2 lavados con 2X SSC (175.3 g de cloruro de sodio y 88.2 g de citrato de sodio) durante 5 minutos a temperatura ambiente
- 2 lavados con 1X SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente
- 2 lavados con 0.5X SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente

El líquido excedente fue drenado y se añadió la solución de bloqueo a las laminillas, las cuales fueron colocadas en cámara húmeda e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las laminillas se drenaron nuevamente y se añadió 100 µl de la solución con el anticuerpo. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo las laminillas fueron enjuagadas en dos ocasiones con buffer TBS (Tris-Buffer Salino) 1X, el líquido excedente fue eliminado. Se agregaron 300 µl de la solución de revelado a las laminillas y se colocaron en la cámara húmeda, se esperó el desarrollo de color en completa oscuridad (cámara cerrada). Concluido el tiempo de revelado, las láminas fueron escurridas y se les añadieron 500 µl de buffer stop y se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Para realizar el contraste de color, se utilizó la solución de café de Bismark (Sigma B-2759, USA) a una concentración de 0.5% durante 2 minutos. Para llevar a cabo el montaje, los tejidos fueron nuevamente deshidratados como se muestra a continuación:

- 2 inmersiones en alcohol 95% durante 1 minuto
- 1 inmersión en alcohol absoluto durante 1 minuto
- 3 inmersiones en xileno durante 5 minutos.

Las láminas fueron montadas en resina sintética diluida en xileno y cubiertas con cubreobjetos (Corning, USA 25 X 50 mm), se dejaron secar a temperatura ambiente durante 12 a 14 horas y finalmente, las laminillas fueron revisadas bajo el microscopio óptico (Olimpus, BX40, Japan)

## APÉNDICE H

Programa de correlación a color para WSSV.

% Inicializacion de Variables

ImgIdxIni = 1;

ImgIdxEnd = 1;

ImgLenIdx = 5;

ImgName = 'ws';

ImgType = 'bmp';

ImgFilter = 'fil';

ImgFilType = 'bmp';

ImgSizeX = 256;

ImgSizeY = 256;

NumFiltros = 100;

Threshold = 24000;

% Inicializacion de Variables

%ImgIdxIni = 1;

%ImgIdxEnd = 2;

%ImgLenIdx = 1;

%ImgName = 'Prueba';

%ImgType = 'bmp';

%ImgFilter = 'Filtro';

%ImgFilType = 'bmp';

%ImgSizeX = 256;

%ImgSizeY = 256;

%NumFiltros = 2;

%Threshold = 24000;

% Algoritmo

% Obteniendo los parametros de la imagen de referencia: Imagen 1..n

for j=ImgIdxIni:ImgIdxEnd

```

% Obteniendo la Imagen
Imagen = ImageRead(ImgName,ImgType,ImgLenIdx,j);
% Leyendo la Imagen j-esima
ICuad = (Imagen .* Imagen .* 255)/Threshold; %
Imagen al Cuadrado
I1 = ICuad(:,1); % Imagen Canal
Rojo = R
I2 = ICuad(:,2); % Canal
Verde = G
I3 = ICuad(:,3); % Canal Azul
B

image(uint8(ICuad)); % Muestra la
Imagen Problema
pause

% Fase
IFase1 = ImageFase(I1,0,3); % Fase de la
Imagen: R
IFase2 = ImageFase(I2,0,3); % Fase de la
Imagen: G
IFase3 = ImageFase(I3,0,3); % Fase de la
Imagen: B

% Inicializacion de la Matriz de Sumas
CorrSuma = zeros(ImgSizeY,ImgSizeX); %
Matriz de las Sumas

for k=1:NumFiltros
% Obteniendo el Filtro
k

```

```

% Obteniendo la Imagen
Imagen = ImageRead(ImgName,ImgType,ImgLenIdx,j);
% Leyendo la Imagen j-esima
ICuad = (Imagen .* Imagen .* 255)/Threshold; %
Imagen al Cuadrado
I1 = ICuad(:,1); % Imagen Canal
Rojo R
I2 = ICuad(:,2); % Canal
Verde G
I3 = ICuad(:,3); % Canal Azul
B

image(uint8(ICuad)); % Muestra la
Imagen Problema
pause

% Fase
IFase1 = ImageFase(I1,0,3); % Fase de la
Imagen: R
IFase2 = ImageFase(I2,0,3); % Fase de la
Imagen: G
IFase3 = ImageFase(I3,0,3); % Fase de la
Imagen: B

% Inicializacion de la Matriz de Sumas
CorrSuma = zeros(ImgSizeY,ImgSizeX); %
Matriz de las Sumas

for k=1:NumFiltros
% Obteniendo el Filtro
k

```

```

% Obteniendo la Imagen
Imagen = ImageRead(ImgName,ImgType,ImgLenIdx,);
% Leyendo la Imagen j-esima
ICuad = (Imagen .* Imagen .* 255)/Threshold; %
Imagen al Cuadrado
I1 = ICuad(:,1); % Imagen Canal
Rojo R
I2 = ICuad(:,2); % Canal
Verde G
I3 = ICuad(:,3); % Canal Azul
B

image(uint8(ICuad)); % Muestra la
Imagen Problema
pause

% Fase
IFase1 = ImageFase(I1,0,3); % Fase de la
Imagen: R
IFase2 = ImageFase(I2,0,3); % Fase de la
Imagen: G
IFase3 = ImageFase(I3,0,3); % Fase de la
Imagen: B

% Inicializacion de la Matriz de Sumas
CorrSuma = zeros(ImgSizeY,ImgSizeX); %
Matriz de las Sumas

for k=1:NumFiltros
% Obteniendo el Filtro
k

```

```

    Filtro = ImageRead(ImgFilter,ImgFilType,1,k);           %
Leyendo el Filtro k-esimo
    FCuad = (Filtro .* Filtro .* 255)/Threshold;           % Filtro al
Cuadrado
    F1 = FCuad(:,:,1);                                     % Filtro Canal
Rojo R
    F2 = FCuad(:,:,2);                                     % Canal
Verde G
    F3 = FCuad(:,:,3);                                     % Canal
Azul B

    %figure(1)
    %image(uint8(FCuad));
    %pause

    FFase1 = ImageFase(F1,0,3);                             % Fase del
Filtro: R
    FFase2 = ImageFase(F2,0,3);                             % Fase del
Filtro: G
    FFase3 = ImageFase(F3,0,3);                             % Fase del
Filtro: B

    % Obteniendo la Correlacion de Fase Extrema
    EspX1 = (exp(i*IFase1)).*conj(exp(i*FFase1));           %
Espectro cruzado: R
    % EspX1 = IFase1.*conj(exp(i*FFase1));
    EspX2 = (exp(i*IFase2)).*conj(exp(i*FFase2));           %
Espectro cruzado: G
    % EspX2 = IFase2.*conj(exp(i*FFase1));
    EspX3 = (exp(i*IFase3)).*conj(exp(i*FFase3));           %
Espectro cruzado: B

```